

**DEMİR YÜKLEMESİ DURUMUNDA TİYOREDOKSİN
SİSTEMİN FARE KARACİĞER VE BÖBREK
DOKUSUNDA GEN VE PROTEİN
SEVİYESİNDE ÇALIŞILMASI**

Feyza SÖNMEZ

Yüksek Lisans Tezi

Doç. Dr. Harun BUDAK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

2018

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DEMİR YÜKLEMESİ DURUMUNDA TİYOREDOKSİN SİSTEMİN
FARE KARACİĞER VE BÖBREK DOKUSUNDA GEN VE
PROTEİN SEVİYESİNDE ÇALIŞILMASI**

Feyza SÖNMEZ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2018**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**DEMİR YÜKLEMESİ DURUMUNDA TİYOREDOKSİN SİSTEMİN FARE
KARACİĞER ve BÖBREK DOKUSUNDA GEN ve PROTEİN SEVİYESİNDE
ÇALIŞILMASI**

Doç. Dr. Harun BUDAK danışmanlığında, Feyza SÖNMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 05/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak ~~oybirliği / oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12.07/2018 tarih ve ..28.../34..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: PRJ2016/151

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirilerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEMİR YÜKLEMESİ DURUMUNDA TİYOREDOKSİN SİSTEMİN FARE KARACİĞER VE BÖBREK DOKUSUNDA GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE ÇALIŞILMASI

Feyza SÖNMEZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman Doç. Dr. Harun BUDAK

Demir, birçok canlı için yaşamsal öneme sahip, yer kabuğunda özellikle çekirdekte yoğun olarak bulunan ve biyolojik önemi eski çağlardan beri bilinen bir elementtir. Demirin elektron alıp verme özelliği nedeniyle oksijen taşınmasında, enerji yapımındaki birçok enzimin katalizlenmesinde, nükleik asit ve protein sentezinde önemli fonksiyonları vardır. Demir metabolizmasındaki düzensizlikler alzheimer, parkinson, hereditör hemakromatosis, beta-talasemi, demir eksikliği anemisi, kronik böbrek rahatsızlıklarına ve serbest halde bulunan toksik demirin hücrede birikmesiyle oksidatif stres ile hücresel düzeyde hasara neden olabilmektedir. Oksidatif stres durumunda devreye giren antioksidan savunma sisteminin bir parçası olan Tiyoredoksin sistem, önemli bir redoks düzenleyicisidir. Tiyoredoksin sistemde tiyoredoksin (TRX), tiyoredoksin redüktaz (TRXR) ve tiyoredoksin ilişkili protein (TXNIP), oksidatif stres, viral enfeksiyonlar ve UV radyasyon gibi durumlarda uyarılmaktadır. Bu tez çalışmasında, kontrol ve demir yüklemesi yapılmış farelerin karaciğer ve böbrek dokularında tiyoredoksin sistemin gen ve protein seviyesinde nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Demir yüklemesi sonrası karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif stres markırları olan glutatyon sistemindeki bazı metabolitlerin (GSH, GSSG, GSH/GSSG) seviyeleri spektroskopik olarak incelendi ve oksidatif stresin oluşup oluşmadığı gösterildi. Kontrol ve muamele gruplarındaki farelerin karaciğer ve böbrek dokularında demir homeostazisi düzenlenmesinden sorumlu bazı genlerin ve Trx, TrxR ve Txnip'ın kantitatif gen ekspresyonuna Real Time PCR ile bakıldı. TRX, TRXR, TXNIP'ın kantitatif protein ekspresyonları western blot yöntemiyle incelendi. Ayrıca glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve TRXR'nin spesifik enzim aktivitesine spektroskopik olarak bakıldı. Sonuç olarak, demir yüklemesi ile oluşan oksidatif strese karşı antioksidan savunma sisteminin devreye girdiği, tiyoredoksin sistemdeki kantitatif değişimler ile belirlendi.

2018, 108 sayfa

Anahtar Kelimeler: Tiyoredoksin Sistem, Demir Homeostazisi, Karaciğer, Böbrek, Ekspresyon, Spesifik Enzim Aktivitesi

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE THYOREDOXINE SYSTEM TO THE GENE AND PROTEIN LEVEL OF MOUSE LIVER AND KIDNEY TISSUES IN IRON LOADING

Feyza SÖNMEZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetic
Department of Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Harun BUDAK

Iron is an element that has vital importance for many organisms and is found in the earth's crust, especially in the nucleus, which has been known since ancient times. Due to its electron transfer capability, it has important functions in oxygen transport, catalysis of many enzymes in energy production, nucleic acid and protein synthesis. Irregularities in iron metabolism Alzheimer's, Parkinson's, Hereditary hemachromatosis, Beta-thalassemia, Iron deficiency anemia, Chronic kidney disorders, and accumulation of free toxic iron in the cell can cause damage at the cellular level by oxidative stress. The thioredoxin system, which is part of the antioxidant defense system that is introduced in the event of oxidative stress, is an important redox regulator. In the thioredoxin system, thioredoxin (TRX), thioredoxin reductase (TRXR) and thioredoxin related protein (TXNIP) are stimulated in situations such as oxidative stress, viral infections and UV radiation. In this thesis study, how the thioredoxin system affects gene and protein levels in control and iron-implanted mouse liver and kidney tissue has been investigated. Some metabolites (GSH, GSSG, GSH / GSSG) levels in the glutathione system, oxidative stress markers in liver and kidney tissues after iron uptake, were examined spectroscopically and it was shown whether oxidative stress occurred or not. Quantitative gene expression of some genes and Trx, TrxR and Txnip responsible for the regulation of iron homeostasis in the liver and kidney tissues of control and treatment groups were examined by Real Time PCR. Quantitative protein expressions of TRX, TRXR, TXNIP were examined by western blot method. In addition, specific enzyme activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and TRXR were spectroscopically examined. As a result, the antioxidant defense system against the oxidative stress caused by iron loading was determined by the quantitative changes in the thioredoxin system.

2018, 108 pages

Keywords: Thioredoxin System, Iron Homeostasis, Liver, Kidney, Expression, Specific Enzyme Activities

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak gerçekleştirilen bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Komisyonu tarafında PRJ2016/151 nolu ‘Tiyoredoksin Sisteminin Demir Yükleme ve Akut İnflamasyon Durumunda Fare Karaciğer ve Böbrek Dokusundaki Fonksiyonunun Gen ve Protein Seviyesinde Çalışılması’ konulu proje kapsamında desteklenmiş olup bu çalışma Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (DAYTAM) gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasına verdikleri destekten dolayı Atatürk Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Çalışma boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK’a, çalışmalarımın her aşamasında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını benden esirgemeyen bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL’e teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına, çalışmalarımın farklı aşamalarında bana yardımcı olan Sayın Dr. Nurdan GÖNÜL BALTACI’ya, Sayın Arş. Gör. M. Özkan BALTACI’ya, Sayın Şeyda Nur ÇAKIR’a, Sayın Aslıhan BASTEM’e, Sayın Berna HUKKAMLI’ya, Sayın Dr. Yeliz DEMİR’e ve diğer grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca hayat boyu benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Sayın Selami SÖNMEZ’e, annem Sayın Gülsüm SÖNMEZ’e, kardeşlerim Sayın Oğuzhan Yusuf SÖNMEZ’e ve Sayın Halit Kağan SÖNMEZ’e teşekkürü bir borç bilirim.

Feyza Sönmez

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Demir Fizyolojisi ve Biyokimyası	1
1.2. Sistemik Demir Metabolizması	2
1.2.1. Demirin vücutta dağılımı.....	2
1.2.1.a. İnorganik demirin (Fe^{3+}) apikal membran boyunca absorpsiyonu	5
1.2.1.b. Organik heme (Fe^{2+}) demirinin absorpsiyonu.....	6
1.2.1.c. Ferroportin ve hephaestin ile demir salınımı	6
1.2.2. Plazma demiri.....	8
1.2.3. Demir metabolizmasının düzenlenmesi	10
1.2.3.a. Demir düzenleyici protein (IRP) aracılı düzenleme	11
1.2.3.b. Hepsidin aracılı düzenleme	12
1.3. Demir Homeostazisinin Bozulması.....	16
1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	19
1.5. Antioksidan Savunma Sistem.....	22
1.5.1. Non-enzimatik antioksidanlar	23
1.5.1.a. Vitamin C (Askorbik asit)	24
1.5.1.b. Vitamin A	24
1.5.1.c. Co-enzim Q10.....	24
1.5.1.d. Ürik asit	24
1.5.1.e. İndirgenmiş/Yükseltgenmiş glutatyon (GSH/GSSG).....	25
1.5.2. Enzimatik antioksidanlar	25
1.5.2.a. Süperoksit dismutaz (SOD)	25
1.5.2.b. Katalaz (CAT)	26

1.5.2.c. Glutasyon peroksidaz (GPx)	27
1.5.3. Tioredoksin sistem	28
1.5.3.a. Tioredoksin	29
1.5.3.b. Tioredoksin redüktaz	31
1.5.3.c. Tioredoksin ilişkili protein	32
2. KAYNAK ÖZETLERİ	34
2.1. Amaç	44
3. MATERYAL ve YÖNTEM	46
3.1. Kullanılan Kimyasallar	46
3.2. Kullanılan Materyal ve Cihazlar	48
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	49
3.4. Farelerde Sistemik Demir Yükleme Modelinin Oluşturulması	52
3.5. Real Time PCR Uygulaması	54
3.5.1. Total RNA izolasyonu	54
3.5.2. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezinde incelenmesi	55
3.5.3. Agaroz jelin hazırlanışı	55
3.5.4. Yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı	56
3.5.5. Elektroforez işlemi	56
3.5.6. Total RNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi	56
3.5.7. cDNA kütüphanesinin hazırlanması	56
3.5.8. Primer ve prob dizaynı	57
3.5.8.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması	57
3.5.8.b. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) analizi	66
3.5.8.c. Real Time PCR sonuçlarının istatistiksel analizi	68
3.6. Antioksidan Sistem Bağımlı Bazı Metabolit Seviyelerinin Ölçümü	69
3.6.1. İndirgenmiş-yükeltgenmiş glutasyon (GSH-GSSG) seviyelerinin ölçümü	69
3.7. Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Demir İçeriğinin Belirlenmesi	71
3.8. Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi	72
3.8.1. Western blot analizi	72
3.8.1.a. Fare karaciğer ve böbrek dokusundan total protein ekstrakte edilmesi	73
3.8.1.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi	73

3.8.1.c. Jeldeki proteinin membrana transferi (blotlama), bloklama ve hedef proteinlerin görüntülenmesi	75
3.9. Spesifik Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	78
3.9.1. Bradford (Commassie Blue) metodu ile protein tayini	78
3.9.2. Tioredoksin redüktaz (TRXR) spesifik enzim aktivitesi ölçümü.....	79
3.9.3. Glutasyon redüktaz (GR) spesifik enzim aktivitesi ölçümü	81
3.9.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) Spesifik Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	82
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	84
4.1. Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Kantitatif Demir İçeriğinin Belirlenmesi	84
4.2. Total RNA İzolasyon Analizi.....	85
4.3. Real Time PCR Analizi Sonuçları.....	87
4.3.1. Karaciğer ve böbrek dokularında demir metabolizması markır genlerinin kantitatif gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.....	87
4.3.2. Antioksidan sistem üyesi olan Tioredoksin sistem markır genlerinin (Trx, TrxR, Txnip) kantitatif gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	88
4.4. Antioksidan Bağıntılı Bazı Metabolitlerin Ölçüm Sonuçları	89
4.5. Spesifik Enzim Aktivitesi Sonuçları ve Analizleri.....	91
4.5.1. Glutasyon redüktaz (GR) spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi	91
4.5.2. Glutasyon peroksidaz (GPx) spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi	91
4.5.3. Tioredoksin redüktaz (TRXR) spesifik enzim aktivitesi sonuçları	92
4.6. Kantitatif Western Blot Analizi Sonuçları	93
4.6.1. Tioredoksin redüktaz (TRXR) proteininin western blot analizi sonuçları	93
4.6.2. Tioredoksin ilişkili protein (TXNIP) western blot analizi sonuçları.....	94
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	95
KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	109

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µL	Mikrolitre
bç	Baz Çifti
dk	Dakika
Fe ²⁺	Ferröz Demir
Fe ³⁺	Ferrik Demir
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
T _m	Erime Sıcaklığı
UV	Ultra Viole

Kısaltmalar

·OH	Hidroksil Radikali
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
CAT	Katalaz
CP	Seruplazmin
DCT1	Divalent Katyon Transportır 1
Dcytb	Duodenal Sitokrom B
DMT1	Divalent Metal Transportır 1
FAD	Flavine Adenin Dinükleotid
Fe-NTA	Ferrik Nitrilotriasetat
FPN1	Ferroportin 1
FTH	Ferritin
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HAMP	Hepsidin
HCP1	Heme Taşıyıcı Protein 1
HFE	Homeostatik Demir Düzenleyici
Hfe2	Yüksek Demir Geni 2
HH	Hereditör Hemokromatozis
HJV	Hemojuvelin
HNE	4-Hidroksinonenalinin
HO·	Hidroksil Radikali
HO-1	Heme-oksidad 1
HO-2	Heme-oksidad 2
IDA	Demir Eksikliği Anemisi
IL-6	İnterlökin-6

IREs	Demir Duyarlı Elementler
IRP	Demir Düzenleyici Protein
LEAP-1	Antimikrobiyal Protein-1
LIP	Değişken Demir Havuzu
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	Nitrik Oksit
Nox	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz
NTBI	Transferine Bağlanmayan Demir
O ₂ ⁻	Süperoksit Anyonu
PRX	Peroksiredoksin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SEC	Selenosistein
SOD	Süperoksit Dismutaz
T2DM	Tip 2 Diyabet
TBP-2	Tiyoredoksin Bağlayıcı Protein 2
Tf	Transferin
TFR1	Transferin Reseptör 1
TFR2	Transferin Reseptör 2
TGF-B	Transformasyon Büyüme Faktörü-B
TMPRSS6	Transmembran Serin Proteaz Matriptaz-2
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- α
TRX	Tiyoredoksin
TRX1	Tiyoredoksin1
TRX2	Tiyoredoksin2
TRXR	Tiyoredoksin Redüktaz
TXNIP	Tiyoredoksin İlişkili Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Vücutta demirin emilimi, kullanımı ve depo şekli	3
Şekil 1.2. Demirin enterositlerde absorbe edilip kana verilmesi	4
Şekil 1.3. Diyetle vücuda alınan heme ve non-heme demirinin bağırsak lümeninden emilimi	5
Şekil 1.4. Ferroportin ve hephaestin/seruloplazmin (CP) aracılı demir salınımı.....	8
Şekil 1.5. Hephaestin aracılığı ile ferrik demirin (Fe^{3+}) ferröz demire (Fe^{2+}) oksidize reaksiyonu	8
Şekil 1.6. Plazmada transferine bağlanan demirin reseptörü ile hücre içersine alınması	9
Şekil 1.7. Hepsidin hormonun eksprese olduğu ve baskılandığı durumlar ve etkilediği dokular	13
Şekil 1.8. Organizmadaki hepsidin ve demir metabolizmasının ilişkisi.....	14
Şekil 1.9. Hepsidin ekspresyonun düzenlenmesi	16
Şekil 1.10. Demir metabolizmasının değişimi ve organizmadaki hasarları.....	17
Şekil 1.11. Demir molekülü ile gerçekleşen ROS döngüsü.....	18
Şekil 1.12. Fenton reaksiyonu ve demir metabolizması	18
Şekil 1.13. 1) Süperoksit radikali tarafından Fe (III)'ün indirgendiği, biyolojik öneme sahip olan demirin katalizlenmesi redoks reaksiyonu, 2) Fenton reaksiyonu 3) Haber-Weiss reaksiyonu	19
Şekil 1.14. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları	19
Şekil 1.15. Serbest radikallerin oluşumu ve hücreye verdiği hasar	22
Şekil 1.16. Antioksidan savunma sistem	23
Şekil 1.17. Süperoksit dismutaz enzim reaksiyonu	26
Şekil 1.18. Katalaz enzim reaksiyonu.....	26
Şekil 1.19. İndirgenmiş glutatyon (GSH) reaksiyon.....	27
Şekil 1.20. Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) reaksiyonu.....	27
Şekil 1.21. ROS'ların enzimatik antioksidanlar tarafından nötralize edilmesi.....	28

Şekil 1.22. A) Yükseltgenmiş TRX (TRX-S ₂) ve indirgenmiş TRX (TRX-SH ₂). NADPH kullanılarak, TRXR aracılığıyla TRX'in indirgenme/yükseltgenmesi ve hedef proteinin TRX ile redükte edilmesi, B) TXNIP, indirgenmiş TRX ile disülfit bağı kurarak TRX'i inhibe etmesi	29
Şekil 1.23. TRX'in 3 boyutlu yapısı	30
Şekil 1.24. TRX sistemin redoks döngüsü.....	31
Şekil 1.25. Tiyoredoksin redüktazın katalitik reaksiyonu	32
Şekil 1.26. TXNIP-TRX ilişkisi A) TRX'i indirgeyerek TXNIP aktive olur ve TRX'i inaktive eder, B) Oksidize haldeki TRX ve TXNIP arasında disülfit değişim reaksiyonu mümkün değildir.....	33
Şekil 2.1. Oksidatif strese karşı iki ana koruyucu sistem	42
Şekil 3.1. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanmış etik kurul belgesi	53
Şekil 3.2. Primer ve prob dizayn etmek için kullanılan NCBI sayfası	58
Şekil 3.3. Primer ve prob dizayn etmek için kullanılan organizmanın seçildiği ve ilgili genin özelliklerini gösteren NCBI sayfası	59
Şekil 3.4. İlgili genin, gen ve protein sekansını gösteren NCBI sayfası.....	59
Şekil 3.5. İlgili genin sekansının bulunduğu veritabanı.....	60
Şekil 3.6. İlgili genin protein kodlayan bölgesinin gösterildiği internet sayfası	60
Şekil 3.7. Trx1 genine ait kodlanan ve kodlanmayan dizinin bulunduğu veritabanı	61
Şekil 3.8. Trx1 genine ait FASTA dizisi.....	61
Şekil 3.9. Primer ve prob tasarlamak için kullanılan veritabanı	62
Şekil 3.10. Primere ait bilgilerin girildiği sayfa.....	63
Şekil 3.11. Proba ait bilgilerin girildiği sayfa	63
Şekil 3.12. tasarlanan primer ve probuna ait özellikleri gösteren sayfa	64
Şekil 3.13. Gen sekans homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası	65
Şekil 3.14. Tasarlanan primer ve probun homolojisinin kontrol edilmesi için blastlandığı sayfa.....	65
Şekil 3.15. Glutatyon standart grafik eğrisi	71

Şekil 3.16. Total demir içeriği standart eğrisi.....	72
Şekil 3.17. Western blot tekniğinin şematize edilmiş şekilde detaylı görseli.....	77
Şekil 4.1. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda total demir içeriğinin belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda total demir içeriğinin belirlenmesi	84
Şekil 4.2. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusundan izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusundan izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	85
Şekil 4.3. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda Fth, Fpn ve Hamp genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda Fth ve Fpn genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi	88
Şekil 4.4. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusundaki Trx, TrxR ve Txnip genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusundaki Trx, TrxR ve Txnip genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi	89
Şekil 4.5. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda GSH, GSSG ve GSH/GSSG metabolit seviyelerinin belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda GSH, GSSG ve GSH/GSSG metabolit seviyelerinin belirlenmesi	90
Şekil 4.6. A) Kontrol ve demir yüklemesi yapılmış muamele grubu fare karaciğer dokusunda GR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi, B) Kontrol ve demir yüklemesi yapılmış muamele grubu fare böbrek dokusunda GR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi	91
Şekil 4.7. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda GPx spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda GPx spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi	92

Şekil 4.8. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda TRXR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda TRXR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi	92
Şekil 4.9. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda TRXR protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda TRXR protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi.....	93
Şekil 4.10. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda TXNIP protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi, B) Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda TXNIP protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi	94
Şekil 5.1. Glutasyon metabolizmasında görevli enzimler ve metabolitler	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez dahilinde kullanılan kimyasal ve kitler.....	46
Çizelge 3.2. Tez dahilinde kullanılan materyal ve cihazlar	48
Çizelge 3.3. Tez dahilinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	49
Çizelge 3.4. cDNA sentez kiti protokolü	57
Çizelge 3.5. Gen ekspresyon profillerine bakılacak genler için dizayn edilen primer ve prob listesi	66
Çizelge 3.6. Taqman Probe (Multipleks Real Time PCR) reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal konsantrasyonu ve kullanılan miktar	67
Çizelge 3.7. GSH ve GSSG ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü.....	70
Çizelge 3.8. SDS PAGE jel elektroforezi için kullanılan ayırma jeli solüsyon miktarı	74
Çizelge 3.9. SDS PAGE jel elektroforezi için kullanılan yükleme jeli solüsyon miktarı	75
Çizelge 3.10. Western blot uygulaması için kullanılan primer antikor listesi	78
Çizelge 3.11. Western blot uygulaması için kullanılan sekonder antikor listesi	78
Çizelge 3.12. Bradford (Coomassie Blue) protein tayini metodunda uygulama prosedürü	79
Çizelge 3.13. TRXR spesifik enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	80
Çizelge 3.14. GR spesifik enzim aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	81
Çizelge 3.15. GPx spesifik enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	82
Çizelge 4.1. Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusundan elde edilen total RNA saflık ve konsantrasyon miktarı	86
Çizelge 4.2. Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusundan elde edilen total RNA saflık ve konsantrasyon miktarı	86

1. GİRİŞ

1.1. Demir Fizyolojisi ve Biyokimyası

Demir parlak, yumuşak, gümüş-gri renginde, bir d-grubu metalidir. Doğada demirin dört farklı kristalin formda (bivalent demir (II), demirli bileşikler, trivalent demir (III) ve ferrik bileşikler) olduğu bilinmektedir. Rutubetli havada paslanan, derişik asitle muamele edildiğinde kolayca eriyen demir kimyasal olarak aktiftir. Dünyaya bir meteor yağmuruyla geldiği ve dünyanın çekirdeğinde büyük oranda demir-nikel alaşımı bulunduğu tahmin edilmektedir. Yerkabuğunda yaklaşık %34,6 oranında varoluşuyla evrende en bol bulunan, dördüncü element ve onuncu öğedir (Anonymous 2017).

Demir canlı organizmalarda oksijen transportu, enerji metabolizması, DNA sentezi gibi hayati öneme sahip olan biyokimyasal aktivitelerde kofaktör olarak kullanılmaktadır. Demirin redoks potansiyeli ve esnek kimyasal koordinasyon özelliği katalitik reaksiyonlarda aracılığına, elektron transfer etmesine, oksijen bağlamasına ve proteinlerle kolay ilişki kurmasına izin vermektedir (Wang and Pantopoulos 2011). Demirin bir diğer önemi ise biyolojik ligantları bağlama özelliğinden dolayı multioksidan durumlarda görev alması, oksidatif, redoks ve elektron dönüşümü durumlarında ihtiyaca göre potansiyelinin düzenlenebilmesidir. Hem grubu içeren organik demir, oksijen bağlama, hemoglobin, oksijen metabolizması, hücresel yenilenme ve düzenleme, elektron transport sistemi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görevli olan hemoproteinlerin yapısında bulunmaktadır. Hem grubu içermeyen inorganik demir, organizmadaki demir depolarının kontrolünü ve transportunu sağlayan proteinlerin yapısında bulunmaktadır (Pantopoulos *et al.* 2012).

Demir metabolizmasının fizyolojisi ve fizyopatolojisi ile ilgili gerçekleştirilen kapsamlı araştırmalarda son yıllarda büyük bir ilerleme olmuştur. Demir metabolizması memelilerde çok hassas bir denge içindedir. Ancak hücre içerisinde biriken serbest demir toksik olduğu için memelilerde demirin emiliminin, transportunun, kullanımının

ve atılımının düzenlenme mekanizması oldukça gelişmiştir. Demirin, gen ve protein-protein ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için Ironomics biliminin ilerleyen zamanlarda daha da gelişeceği düşünülmektedir (Waldvogel-Abramowski *et al.* 2014).

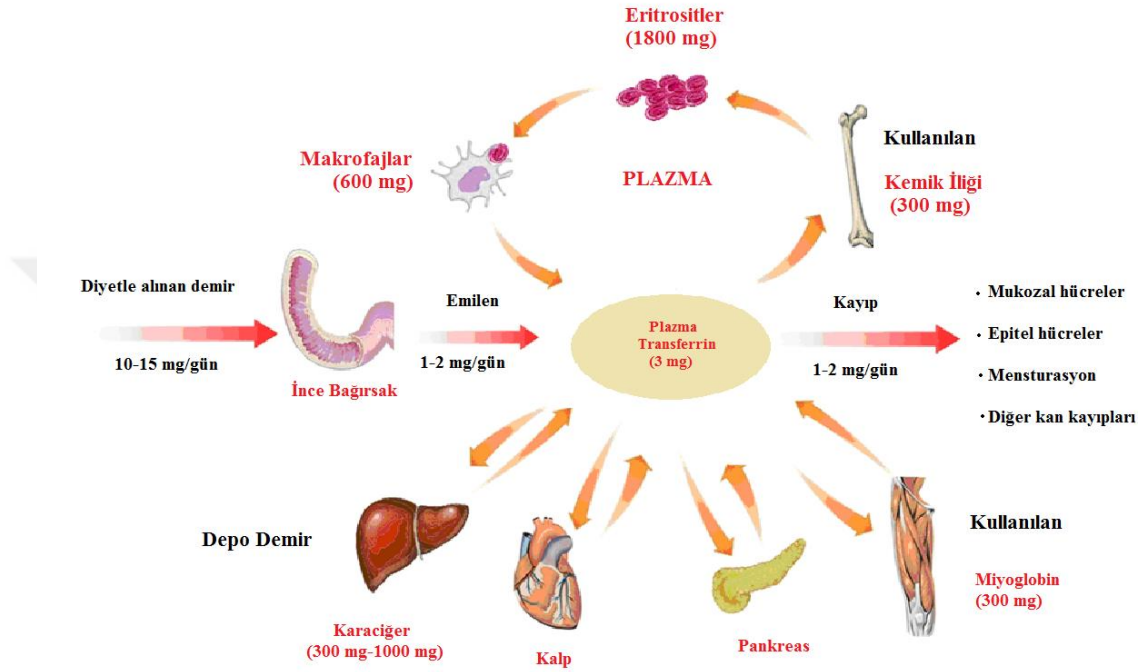
1.2. Sistemik Demir Metabolizması

1.2.1. Demirin vücutta dağılımı

Demir içerikli yiyecekler vücudun ihtiyacı olan metal için yeterli bir kaynaktır. Vücutta oluşan kan, mukozal hücre, epitel hücre kayıpları ve mensturasyon dönemleri ile meydana gelen demir kaybını telafi etmek için ideal bir diyetle günlük 1-2 mg demir emilimi olmaktadır. Yetişkinlerde cinsiyete, beslenme alışkanlıklarına ve sağlık koşullarına göre değişmekle beraber 3 ile 5 gr arasında depo demir bulunmaktadır. Demirin emilimini, transportunu, depo edilmesini ve immün sistemde rolünün düzenlemesini gerçekleştiren kemik iliği hücreleri, eritrositler ve makrofajlar total demirin yaklaşık %70'ini kullanmaktadırlar (Daher *et al.* 2017).

Diyetle alınan demirin, ince bağırsak lümeninde bulunan emilim hücreleri tarafından absorbe edildikten sonra çoğu eritrosit hücreleri tarafından hemoglobin üretimi veya miyoglobinlerde kullanılmaktadır. Emilen demirin dalak, karaciğer ve kemik iliğine yolculuğu devam etmektedir (yaklaşık 600 mg). Eritrositlerde yaklaşık 2 gr, kaslarda ise 300 mg demir bulunmaktadır. Yaklaşık olarak 1000 mg kadar fazla demir ihtiyaç duyulduğunda kullanılmak üzere karaciğer parankima hücrelerinde bulunan ferritinde depo edilmektedir (Pantopoulos *et al.* 2012). Hücrede bulunan 1 ferritin molekülü 4500 demir atomunu depo edebilmektedir (Brissot *et al.* 2012). Ayrıca kandaki demir miktarı ferritin molekülü ile ölçülmektedir. Ferritin molekülünün ana kontrolü makrofajlar tarafından yapılmaktadır. İnflamasyon, çeşitli enfeksiyonlar ve karaciğer hastalıkları gibi koşullardan etkilenmesine rağmen ferritin vücuttaki demir miktarıyla yakından ilişkilidir (Wood 2014). Demirin bir diğer kullanım şekli ise (yaklaşık 8 mg) hücrelerde bulunan demir içerikli proteinlere ve enzimlere bağlanmasıdır. Yaklaşık 3 mg demirin dokulara ve eritroblastlara dağılımı transferrin sirkülasyonu ile gerçekleştirilmektedir

(Şekil 1.1). Bir günde 10 veya daha fazla transferrin-demir (Tf-Fe) kompleksi oluşup ayrıldığı ve bu olay sayesinde vücuttaki demir havuzlarının dinamik tutulduğu düşünülmektedir (Pantopoulos *et al.* 2012).



Şekil 1.1. Vücutta demirin Emilimi, kullanımı ve depo şekli (Grotto 2010)

Diyetle vücuda alınan demirin bir kısmı organik heme demiri (Fe^{2+}) ve bir kısmı ise inorganik non-heme demiridir (Fe^{3+}). Demirin emilmesi ve kana verilip dokulara dağıtılması sürecinde 4 adet anahtar hücre görev almaktadır. Bu hücreler bağırsak lümeninde bulunan hücreler (enterosit), eritroblastlar, makrofajlar ve karaciğer hücreleridir (hepatosit).

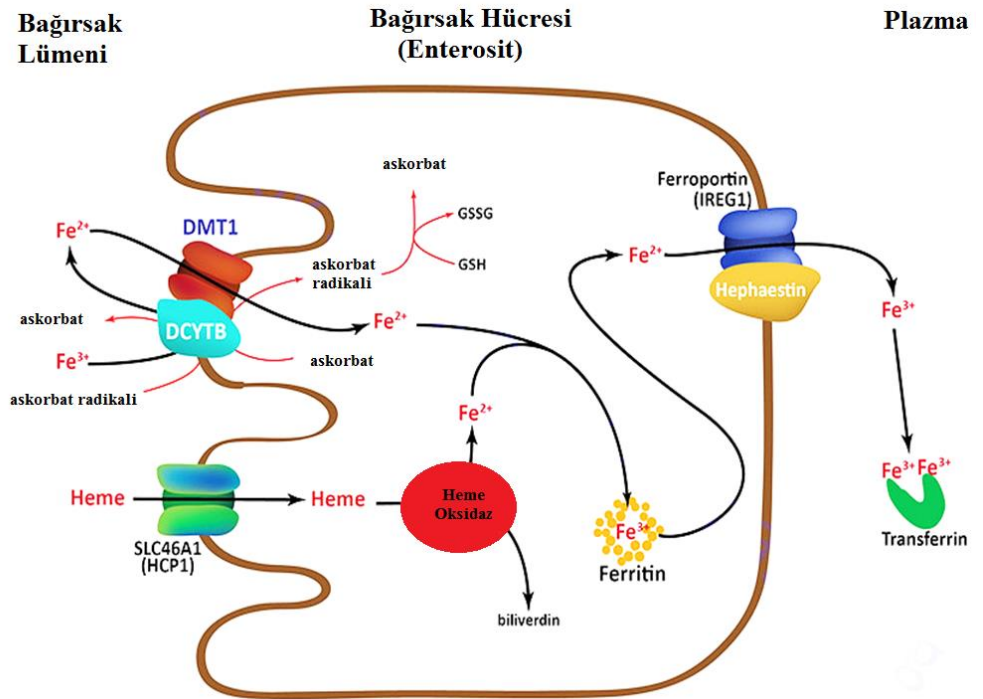
Enterositler, demirin absorbe edildiği ve kan transfüzyonu ile alınan demir ya da parental demir enjeksiyonu ya da infüzyonu ile alınan demir haricinde vücuttaki total vücut demirini düzenlemektedir.

Eritroblastlar, demiri çekirdeksiz bir yapıda oldukları için daha rahat kullanabilmektedir.

Makrofajlar, yaşlanan eritroblast ve benzeri kan hücrelerinin parçalanmasını ve aynı zamanda bu parçalanma sonucu açığa çıkan demirin transferrin yoluyla kemik iliğine salınmasını sağlamaktadır.

Karaciğer ise bağırsaktan demir absorpsiyonunun düzenlenmesinde, dalaktan demir salınımının düzenlenmesinde, karaciğer hücrelerinin demir içeriğinin kontrol edilmesinde ve transferrin doygunluğunun gözlemlenmesinde kilit rol oynamaktadır. Aynı zamanda hepsidin, karaciğerde eksprese olan bir hormondur ve bağırsak hücrelerinin demiri absorbe etmesini ve dalak hücrelerinden demirin salınmasını düzenler (Winter *et al.* 2014).

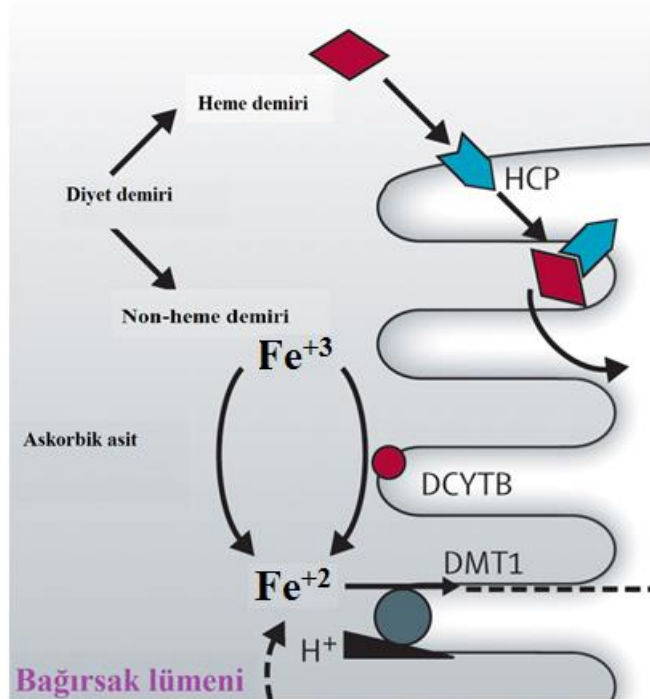
Bağırsakta demir transportu 3 farklı yolak üzerinden gerçekleştirilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Demirin enterositlerde absorbe edilip kana verilmesi (Anonymous 2018)

1.2.1.a. İnorganik demirin (Fe^{3+}) apikal membran boyunca absorpsiyonu

İnorganik non-heme demir (Fe^{3+}) bağırsak lümeninden apikal membran boyunca divalent metal transportör (DMT1) aynı zamanda divalent katyon transportör (DCT1) ve doğal dirence bağlı makrofaj protein 2 (Nramp2) olarak bilinen bir transmembran protein aracılığıyla demir içeri almaktadır. Prokaryot ve ökaryotlarda bir hayli korunmuş olan bu protein 12 transmembran domain bulundurmaktadır. DMT1 diyetle alınan ferröz (Fe^{2+}) demiri ve diğer birçok divalent metali bağırsak lümeninden bağırsak hücreleri içerisine almaktadır (Şekil 1.3). DMT1 ekspresyonu epigenetik olarak düzenlenmesine rağmen bağırsak hücrelerinde çok miktarda bulunmaktadır (Gunshin *et al.* 1997).



Şekil 1.3. Diyetle vücuda alınan heme ve non-heme demirinin bağırsak lümeninden emilimi (Zimmermann and Hurrell 2007)

Diyet demiri ferrik (Fe^{3+}) formda alınmaktadır ancak DMT1 sadece ferröz (Fe^{2+}) formdaki demiri membrandan içeri alabilmektedir. Membrandan içeri alınacak olan

demirin ferröz (Fe^{2+}) forma dönüştürülmesi için membran üzerinde bulunan duadonal sitokrom B (Dcytb) transmembran proteini kullanılmaktadır. Dcytb tahmini 6 adet askorbat radikalini bağlanabileceği domain bulundurmaktadır ve askorbat radikalini bağlayarak bir elektron donörü olarak işlev görmektedir. Elde ettiği elektronlar ile Dcytb ferrik redüktaz aktivitesi görmektedir ve ferrik (Fe^{3+}) halde olan demiri ferröz (Fe^{2+}) hale dönüştürmektedir. Bu işlem sonucunda Dcytb, DMT1 aracılığı ile demirin hücre içerisine alınmasına olanak sağlamaktadır (Chung and Wessling-Resnick 2003).

1.2.1.b. Organik heme (Fe^{2+}) demirinin absorpsiyonu

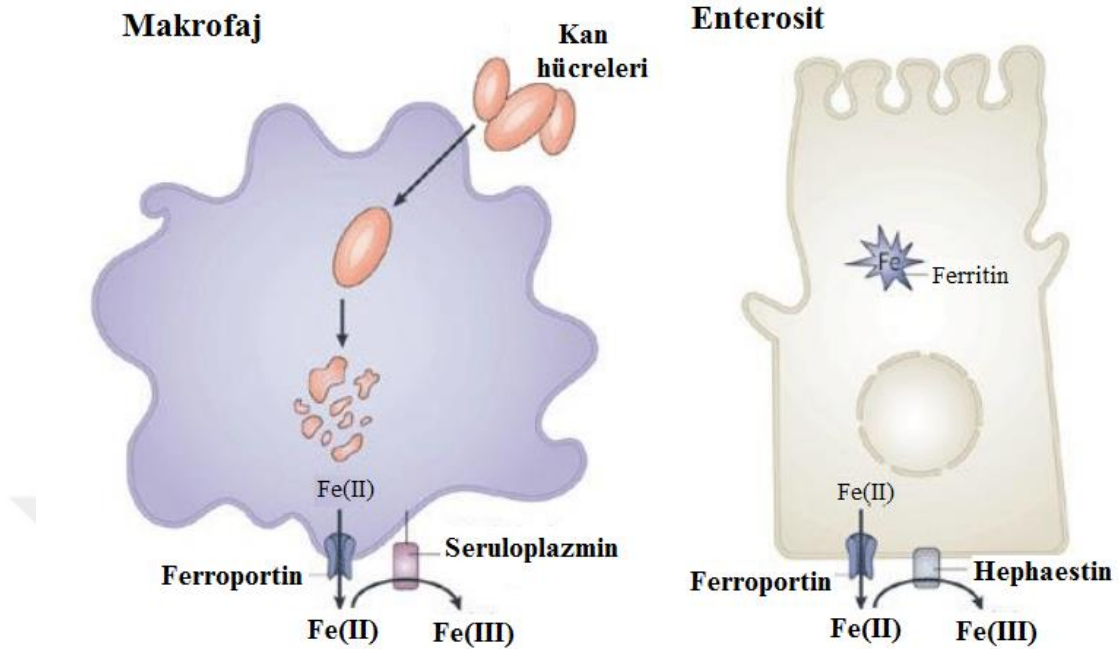
Bağırsak lümeninden organik heme demirinin (Fe^{2+}) içeri alınması inorganik demirin (Fe^{3+}) absorbe edilmesinden daha farklıdır. Organik heme demiri (Fe^{2+}) daha ziyade bağırsak hücrelerinden bozulmamış metalloporfirin olarak absorbe edilmektedir (Uzel and Conrad 1998). Ancak organik heme (Fe^{2+}) demirinin absorbe edilme mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. SLC46A1 ya da heme taşıyıcı protein 1 (HCP1) olarak bilinen iki adet solute taşıyıcı proteinin görev aldığı düşünülmektedir ancak spesifik protein tam olarak karakterize edilememiştir. Bazı öneriler organik heme demirinin (Fe^{2+}) hücre içerisine pasif difüzyon ile alındığı yönündedir (Light and Olson 1990). Pasif difüzyon ile direk transportu ya da endositoz aracılı bir reseptör ile organik heme demiri (Fe^{2+}) absorbe edilmektedir. Heme-oksidad 1 ve 2 (HO-1 ve HO-2) ile makrofajlarda ve enterositlerde kataliz edilen bir reaksiyon ile parçalanmaktadır ve inorganik demir (Fe^{3+}) hücre içerisinde serbest kalmaktadır (Pantopoulos *et al.* 2012).

1.2.1.c. Ferroportin ve hephaestin ile demir salınımı

DMT1 ve heme transportu ile enterositlere alınan demir hücre içinde aynı demir havuzunda birirmektedir. Vücudun ihtiyacına göre bu demir havuzlarından kana ve kandan dokulara demir transportu sağlanmaktadır. Son yapılan araştırmalarda bazolateral membranda demir transportu için işlev gören bir protein keşfedilmiştir. Zebra balıklarında yapılan klonlama (Donovan *et al.* 2000) ile bir transmembran protein olarak tanımlanan ferroportin-1 (Fpn-1), organizmadaki hücreler arası demir

transportunu, demir emilimini ve dokulara iletimini sağlayan ana moleküldür ki bu sebeple demirin depolanması, kullanılması ve emilimi Fpn-1 ile çok hassas bir şekilde düzenlenmektedir (Ward and Kaplan 2012). Ferroportin-1 62,5 kDa, 571 aminoasitten oluşan, 9-12 adet transmembran domaini bulunan bir solute taşıyıcı protein 40 ailesi üyesidir. Bağırsak lümeni hücrelerinde, dalak makrofajlarında ve kupffer hücreleri gibi fagositlerde ve karaciğerde eksprese olmaktadır. Fpn-1'in yapısının anlaşılması için yapılan araştırmalarda yaklaşık 12 domain olan proteinin amino ucunun sitozolik, karboksil ucunun ise ekstraselüler olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer araştırma konusu ise Fpn-1'in monomer mi yoksa dimer mi yapıda olmasıdır ve yapılan genetik araştırmalar neticesinde Fpn-1'in dominant kalıtıldığı ve dimerik yapıda olduğu anlaşılmıştır. Fpn-1 aracılı demir transportu hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Hücre dışına demir taşınımı için gerekli ferroksidaz aktivitesini ferroportin gerçekleştirmektedir ve substrat olarak ferröz demiri (Fe^{2+}) kullanılmaktadır. Bu ferroksidaz aktivitesi, ferroportine yüksek derecede afinitesi olan seruloplazmin (CP) ya da hephaestin tarafından sağlanmaktadır. Seruplazmin kandaki demirin hücre içerisine girişini kolaylaştırmaktadır (Şekil 1.4) (Ward and Kaplan 2012).

Ferröz forma dönüştürülen demir (Fe^{2+}) ferroportin ile bazal membrandan kana salınmaktadır ve yüksek afiniteyle transferine bağlanmaktadır.



Şekil 1.4. Ferroportin ve hephaestin/seruloplazmin (CP) aracılı demir salınımı (Denardo *et al.*)

Hephaestin bağırsak hücrelerinde yüksek seviyede eksprese olan ve membrana bağlı bir oksidazdır.

Hephaestin oksidaz aktivitesi Şekil 1.5'deki reaksiyonda gösterildiği gibi gerçekleşmektedir.

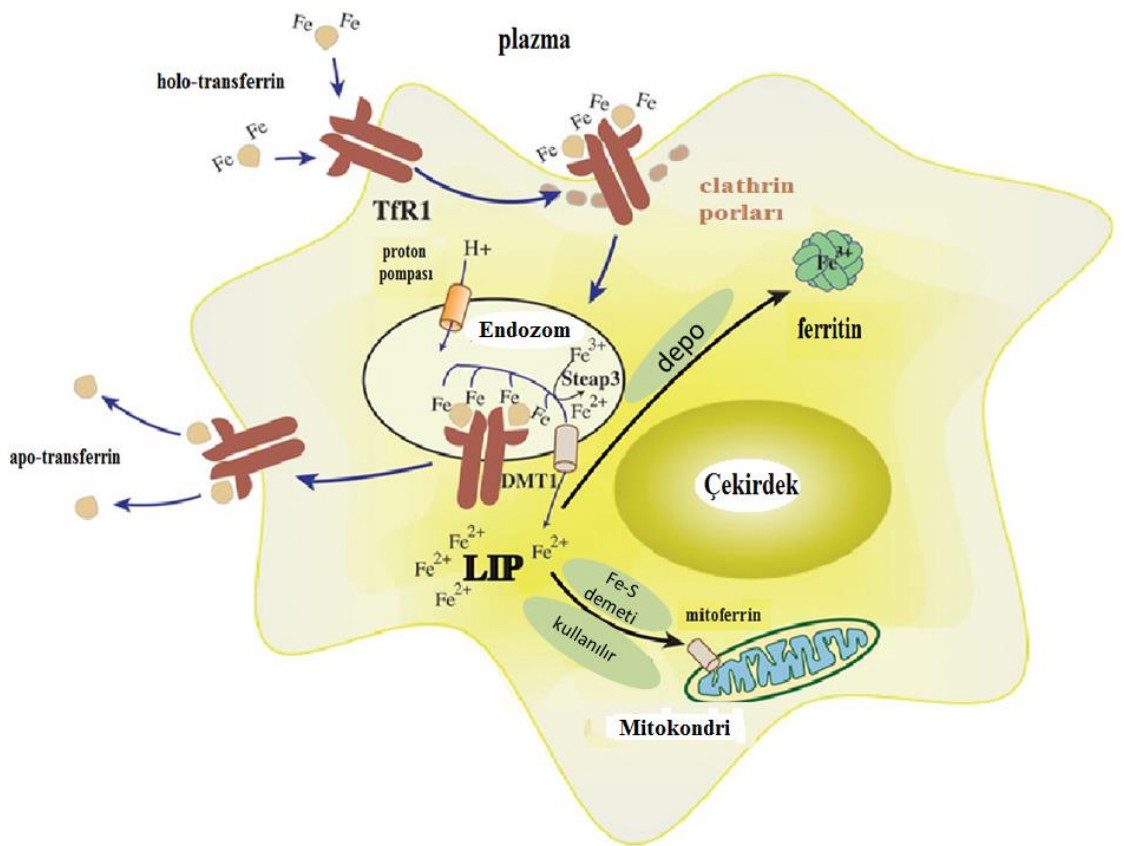


Şekil 1.5. Hephaestin aracılığı ile ferrik demirin (Fe^{3+}) ferröz demire (Fe^{2+}) oksidize reaksiyonu (Ward and Kaplan 2012)

1.2.2. Plazma demiri

Normal koşullar altında hücreden ferroportin aracılı salınan demir kanda serbest halde dolaşmaz ve Transferin molekülüne bağlanmaktadır. Transferin (Tf) karaciğer hücrelerinde eksprese olan 2 demir bağlama bölgesi ile tek bir polipeptit zincirinden

oluşan glikoproteindir. A ve B olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır ve bu bölgelerden her biri 1 adet ferrik (Fe^{3+}) atomu bağlamaktadır. 4 çeşit transferin molekülü olduğu tespit edilmiştir. Bunlar Apotransferin, Monoferrik A Tf, Monoferrik B Tf ve Diferrik Tf dir. Bütün bu transferin çeşitlerinin tek bir havuzdaki demiri bağladığı düşünülmektedir (Brissot *et al.* 2012). Transferin, redoks inert olan 2 demir molekülünü kendine bağlamaktadır ve ilgili yerlere taşımaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Plazmada transferine bağlanan demirin reseptörü ile hücre içersine alınması (Wang and Pantopoulos 2011)

Normal şartlarda kanda demirin bağlı olduğu transferin oranı %20 ile %40 arasındadır. Transferin ile dokulara taşınan demir, bir membran proteini olan Transferin reseptör 1'e (TFR1) bağlanarak hücre içersine alınmaktadır (Pantopoulos *et al.* 2012). Aynı zamanda bir homoloğu ve daha fazla transkripsiyonel düzenlenmesi olan Transferin reseptör-2 (TFR2) keşfedilmiştir. Bu molekülü karaciğer ve eritrositler dahil diğer

dokulardaki transferine bağı olan demirin bir sensörü olduğu düşünölmektedir (Dev and Babitt 2017). Transferine bağı olan demir oranı %35'in üzerine çıkınca transferin doygunluğu meydana gelmektedir ve kanda transferine bağı olmayan serbest demir (transferine bağlanmayan demir (NTBI)) oranı artmaktadır. Kanda bulunan serbest demir karaciğer, kalp, pankreas gibi organların hücrelerindeki demir havuzlarında birikmektedir (değişken demir havuzları (LIP)) ve aşırı demir organlarda hasara neden olmaktadır (Wood 2014). Plazma demiri holo-transferine ve hücre yüzeyindeki TFR1'e bağlanmaktadır ve klatrin porları endositoz yoluyla demiri hücre içine alınmaktadır. Sitoplazmaya alınan demir bir proton pompası ile asidik hale getirilen (pH:5,5) endozoma gelmektedir ve burada Steap3 aracılığıyla ferrik formdan (Fe^{+3}) ferröz forma (Fe^{2+}) dönüştürölmektedir ve endozomal membran üzerinde bulunan DMT1 ile tekrar sitoplazmaya verilmektedir. Sitoplazma demiri metabolik faaliyetlerde kullanılmak üzere mitoferrin reseptörü ile mitokondride ya da fazla demir ferritinde depo edilmektedir. Aynı zamanda apo-transferin ise TFR1 ile kompleks bir şekilde bulunmaktadır ve plazmaya yayılan ferrik demiri geri yakalayıp hücreye getirmektedir (Wang and Pantopoulos 2011).

1.2.3. Demir metabolizmasının düzenlenmesi

Demir, oksijen transportu, biyosentez, detoksifikasyon gibi önemli süreçlerde rol almasından dolayı canlılar için bir iz elementtir. Ancak hücre içersine elektron alıp verme özelliğı demirin bazı durumlarda toksik olmasına neden olmaktadır. Bu yüzden vücutta demir homeostazisi karmaşık bir biyokimyasal ağı ile düzenlenmektedir (Budak *et al.* 2014b).

Demirin taşınmasında, depolanmasında ve kullanılmasında görevli hepsidin (HAMP), ferritin (FTH), ferroportin (FPN) gibi ana proteinler koordineli bir şekilde düzenlenmektedir. Bu proteinlerin üretimi, hücre içi demir miktarı esas alınarak transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel mekanizmalar üzerinden yürütölmektedir (Hentze *et al.* 2004; Meyron-Holtz *et al.* 2004).

Organizmada meydana gelen demir eksikliği ya da demir fazlalığı hücreler ve organeller de çeşitli hasarlara neden olmaktadır. Düşük demir konsantrasyonu eritrositlerin demir alınımı ile giderilmektedir ancak az hemoglobin sentezinden dolayı anemiye neden olmaktadır. Aynı şekilde organizmada meydana gelen demir birikimi ise doku hasarına, nörodejeneratif hasara, kardiyovasküler hastalıklara neden olmaktadır (Ganz and Nemeth 2012).

Canlılarda demir homeostazisi iki farklı yolak üzerinden düzenlenmektedir.

1.2.3.a. Demir düzenleyici protein (IRP) aracılı düzenleme

Hücrel demir metabolizması ilk olarak demir düzenleyici proteinler (IRPs) ile sağlanmaktadır ve post-translasyonel olarak düzenlenmektedir. IRP1 ve IRP2 hücrel demir depolarından sorumlu proteinlerdir. Düşük demir koşulları altında IRP'ler, ferritin ile ferroportin mRNA'sında bulunan 3' ifade edilmeyen bölgelere (UTR) ve DMT1 ile TfR mRNA'sında bulunan UTR'lerde bulunan korunan bölgeler olan demir duyarlı elementlere (IREs) bağlanmaktadır. Gerçekleşen IRPs/3'-IREs bağlantısı mRNA stabilizasyonu sağlamaktadır ve ekspresyonu artırmaktadır. IRP'ler 5'-IRE'ye bağlanırsa ekspresyon durdurulmaktadır. Hücrel demir depolarının ana kontrol molekülleri olan DMT1 ve ferroportin ekspresyonu artması ile hücre içine demir alınımı sağlanmaktadır ve hücre içi demir seviyesi artmaktadır (Hofer *et al.* 2008).

Aynı zamanda organizmada demir birikimi ise sitrat gibi organik anyonlar ve diğer plazma proteinleriyle ilişkili olan transferinin demir bağlama kapasitesinin artmasına neden olmaktadır. Bu olayın neticesinde plazmada serbest demir (NTBI) birikimi meydana gelmektedir. Serbest demir hepatositler ve diğer parankimal hücreler tarafından alınmaktadır ve intraselüler seviyede demir birikimi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu katalizlemekte, doku ve organlara hasar vermektedir. Demir birikimi kalp ve endokrin dokularında hızlı bir şekilde etki gösterirken, karaciğer dokusunda daha yavaş etki göstermektedir (Ganz and Nemeth 2012).

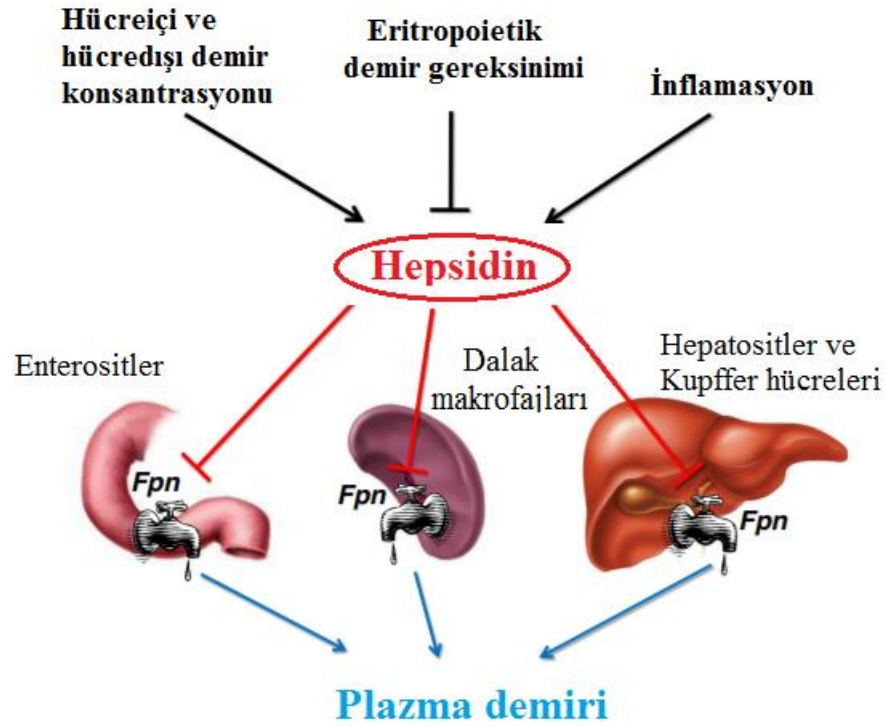
1.2.3.b. Hepsidin aracılı düzenleme

Demirin organizmadaki miktarının hassas sınırlarda tutulması için organizmada hormonal bir düzenleme mevcuttur. Bu düzenleme 19 kromozonda lokalize olmuş hepsidin antimikrobiyal peptit (Hamp) ya da yüksek demir geni 2 (Hfe2) tarafından üretilen hepsidin hormonu ile sağlanmaktadır ve hepsidin hepatositlerde eksprese olan bir peptittir (Ganz and Nemeth 2012).

İlk olarak 1994 yılında Finch, sistemik demir metabolizması ile ilgili yaptığı çalışmalarda demir depolarının düzenlenmesinde çözünebilen bir hormon olduğunu ve bu hormonun demir dengesi açısından zorunlu bir molekül olduğunu öne sürmüştür (Finch 1994). Ancak 2000 li yıllara kadar hepsidinin orijinal adı karaciğerde eksprese olan antimikrobiyal protein-1 (LEAP-1) olarak ve karaciğerde eksprese olan 4 disülfid bağı ile 25 adet antimikrobiyal peptit residüzü bulunan bir hormon olarak tanımlanmaktadır (Schmidt 2015).

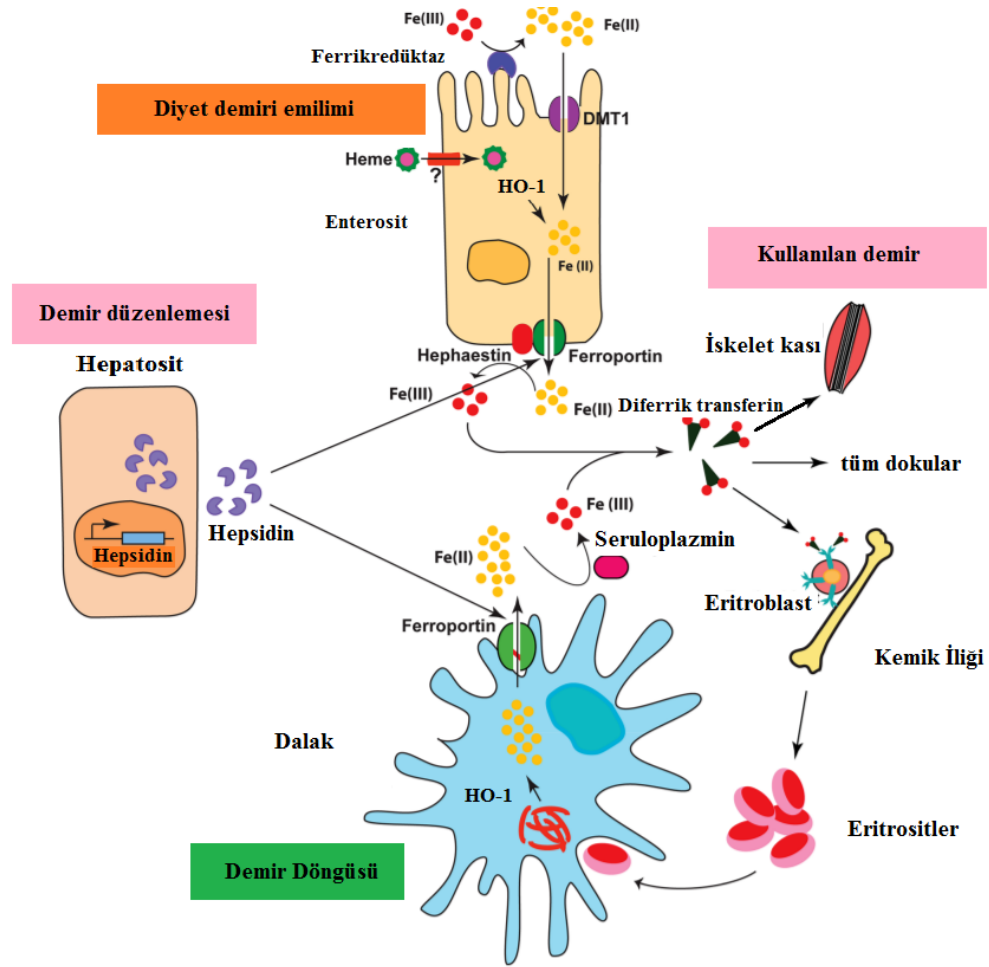
Hepsidinin kontrolü demir depolarının durumu, demir konsantrasyonu ve eritropoietik aktivite gibi farklı sistemik olaylarla kontrol edilmektedir. Bu nedenle hepsidin demir metabolizmasının ana düzenleyicisidir (Ganz and Nemeth 2012).

Hepsidin hücreden plazmaya demir transportunu sağlayan ferroportine bağlanmaktadır. Ferroportini degrade etmektedir ve demirin hücre içerisinde kalması sağlayan bir negatif düzenleyicidir (Şekil 1.7) (Schmidt 2015).



Şekil 1.7. Hepsidin hormonun eksprese olduğu ve baskılandığı durumlar ve etkilediği dokular (Ganz and Nemeth 2012)

Makrofajların plazma membranında bulunan ferroportin, hepsidin ana reseptörüdür ancak bağırsak lümeninde bulunan hücrelerdeki ferroportin için bu mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Makrofajlarda bu mekanizma iki proteinin ilişkisi ile gerçekleşirken bağırsaklarda hepsidin seviyesi azalmasına rağmen ferroportinin ekspresyonunda herhangi bir değişim meydana gelmemektedir. Bunun aksine apikal membranda bulunan DMT1 degradasyonu veya ubiquitinasyonu hepsidin ekspresyonunu hızlandırmaktadır. Hepsidin sentezi farklı sinyallerle kontrol edilmektedir ve bu mekanizmalar sadece kısmen aydınlatılmıştır. Dokularda ve serumda demir seviyesinin yükselmesi, inflamasyon gibi durumlar hepsidin ekspresyonunu artırırken, demir eksikliği, hipoksi, hemoliziz gibi durumlarda hepsidin ekspresyonu azalmaktadır. Bütün bu faktörler hepsidin kodlayan Hamp geninin ekspresyonunu düzenleyen farklı moleküler yollarlardır. Hepsidin hem transferine (Tf) bağlı demir, hem de hücre içi depo halindeki demir seviyesi ile düzenlenmektedir (Daher *et al.* 2017).



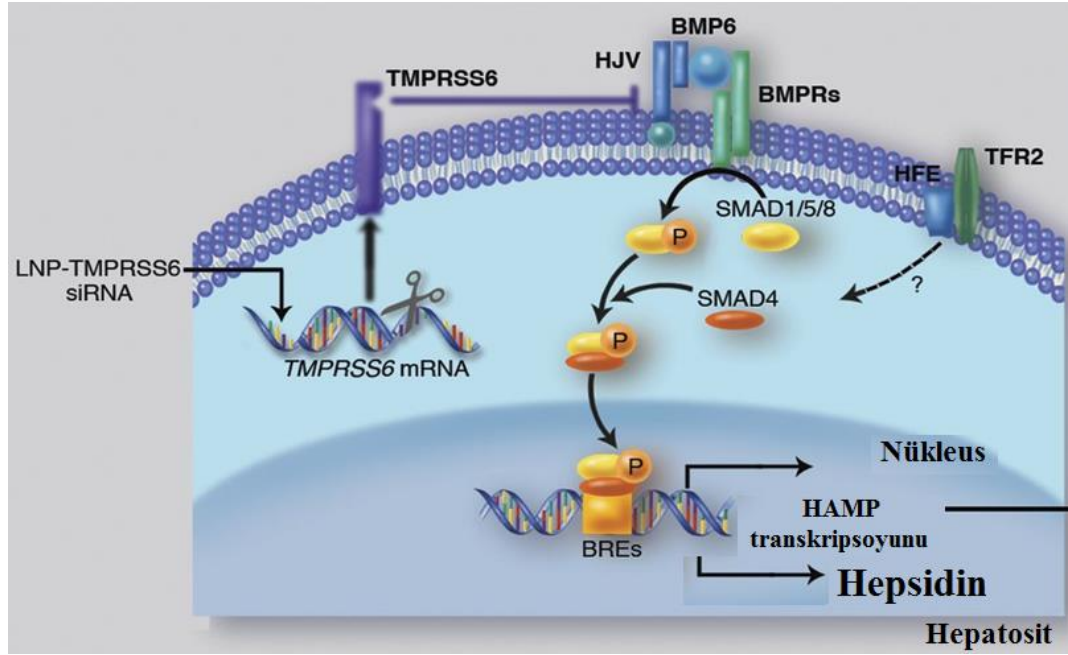
Şekil 1.8. Organizmadaki hepsidin ve demir metabolizmasının ilişkisi (Pantopoulos *et al.* 2012)

Son yapılan çalışmalarda kemik morfojenetik protein (BMP) sinyal yolağının karaciğerde hepsidin ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik rol aldığı bulunmuştur. BMP yolağı hepsidin ekspresyonun ana düzenleyicisidir. BMP'ler embriyonik ve doğum sonrası gelişim olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde farklı tipteki BMP reseptörlerine bağlanarak sinyaller ile kontrolü sağlanmaktadır (Babitt *et al.* 2006; Çakır 2016; Baltacı 2018). BMP sinyalinin reseptörüne bağlanması sonucu bu olay sitoplazmik SMAD1/SMAD5/SMAD8'in fosforilasyonunu uyarmaktadır ve fosforilasyondan sonra SMAD4 bu komplekse transloke olmaktadır. Oluşan kompleks nükleusa geçmekte, burada bir transkripsiyon faktörü olarak davranmakta ve DNA üzerindeki BMP ilgili promotör bölgeye bağlanmaktadır (Wang *et al.* 2005). BMP

sinyalinin oluşması, demir metabolizması için spesifik bir molekül olan Hemojuvelin (HJV) ile zıt bir ilişki içerisinde düzenlenmektedir.

BMP/HJV kompleksinin yanında, hepsidin metabolizmasını düzenleyen bir diğer faktör ise transferrin reseptör-2 (TFR2) ve homeostatik demir düzenleyici (HFE) molekülleridir. Bu iki molekül yetişkin bir bireyde mutasyona uğrarsa organizmada demir birikimi meydana gelmektedir. TFR2 öncelikle karaciğerde eksprese olur ve mRNA seviyesinde iken demir depoları tarafından etkilenmez. HFE, MHC sınıf-I benzeri bir moleküldür ve direk demir bağlamaz ancak demir bağlayan proteinler, TFR1 ve TFR2 ile ilişkilidir. HFE mekiği, TFR1 ve TFR2'nin bağladığı demir konsantrasyonu ile düzenlenmektedir. Ancak son yapılan çalışmalarda transferrine bağlı olan demirin düzenlediği hepsidin ile ilişkilendirilebilmesi için HFE ve TFR2'nin ilişkili olması gerektiği anlaşılmıştır. HFE/ TFR2 kompleksinin hepsidin ekspresyonunu nasıl teşvik ettiği tam olarak anlaşılamamıştır ancak bu kompleksin BMP yolağına dahil olduğu görülmüştür (Nemeth and Ganz 2009).

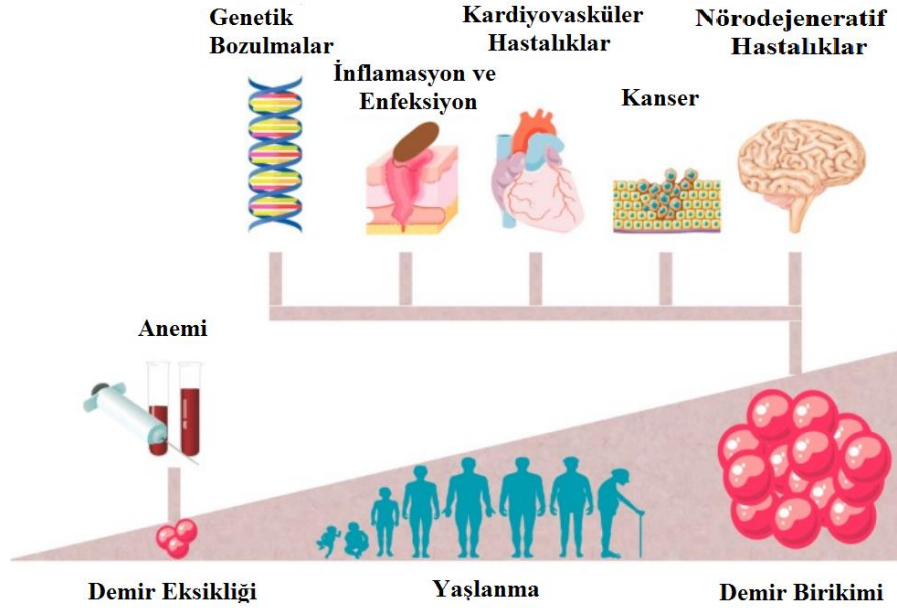
Transmembran serin proteaz matriptaz-2 (TMPRSS6) karaciğerde eksprese olan ve organizmadaki demir metabolizmasının negatif düzenleyicisidir. Bu proteini kodlayan gen eksprese olduğu zaman hepsidin metabolizmasının ilk adımı olan BMP'lerin HJV ile birleşip membran üzerindeki reseptörüne bağlanmasını engeller ve hepsidin ekspresyonunun uyarılması durdurulmuş olmaktadır. Bu genin ekspresyonu LNP-TMPRSS6 small interferans RNA (siRNA) ile durdurulmaktadır ve hepsidin ekspresyonu için gerekli uyarılma sağlanmaktadır (Şekil 1.9). Ancak TMPRSS6 proteinin çalışma mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ama bu genin mutasyonu durumunda demir eksikliği anemisi olduğu görülmüştür (Finberg *et al.* 2008).



Şekil 1.9. Hepsidin ekspresyonunun düzenlenmesi (Silvestri 2013)

1.3. Demir Homeostazisinin Bozulması

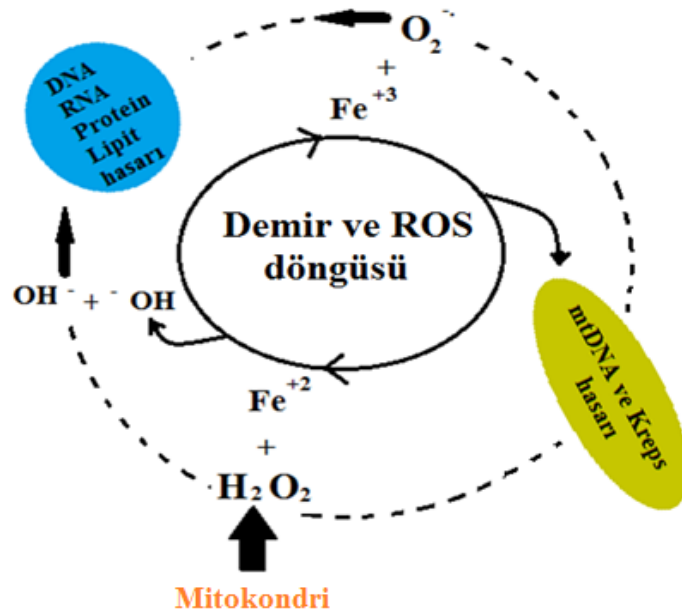
Demir, hücre içerisinde fazla miktarda bulunması toksit etkilere neden olan organizma için hayati öneme sahip olan bir moleküldür (Puntarulo 2005). Demir bağımlı enzimlerin aktiviteleri kaybetmeleri ve oksijen transportunun azalması gibi nedenlerden dolayı meydana gelen demir eksikliği ve oksidatif stres, reaktif hidroksil radikalının oluşumunun katalizlenmesi, programlanmış hücre ölümleri gibi sonuçlara neden olan demir dengesi memelilerde hassas bir şekilde kontrol edilmektedir. Ferroportin-hepsidin, IRE/IRPs mekanizmasından sorumlu genlerin keşfinden sonra demir metabolizmasında rol alan moleküller ve mekanizmalar daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Organizmadaki demir homeostazisin de rol oynayan genler, enzimler ve proteinlerden herhangi birinde meydana gelen bir bozulma demir metabolizmasında düzensizlik ve karaciğer başta olmak üzere birçok dokuda hasara neden olmakta ve çeşitli hastalıklar ile sonuçlanmaktadır (Gozzelino and Arosio 2016).



Şekil 1.10. Demir metabolizmasının değişimi ve organizmadaki hasarları (Gozzelino and Arosio 2016)

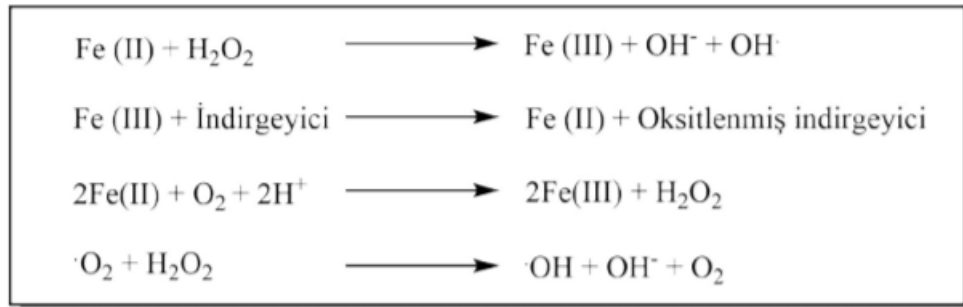
Hücre içerisinde demir ve oksijenin birçok biyolojik süreçte ilişkili olması esastır ancak bu iki molekül arasındaki etkileşimden kaynaklanan, potansiyel olarak zarar verici sonuçlara dikkat çekilmektedir. Hücrede demir birikimi oksijen molekülünün yapısını değiştirerek ROS oluşmasını sağlamaktadır. Hücrede oluşan ROS'lar ise çeşitli mutasyonlara sebep olarak DNA, lipid membrana ve proteinlerin yapısına zarar vererek hücrel hasara neden olmaktadır (Puntarulo 2005).

Hücrede fazla demir Fe/H_2O_2 bağının oluşmasına ve hidroksil radikalının oluşmasına neden olmaktadır.



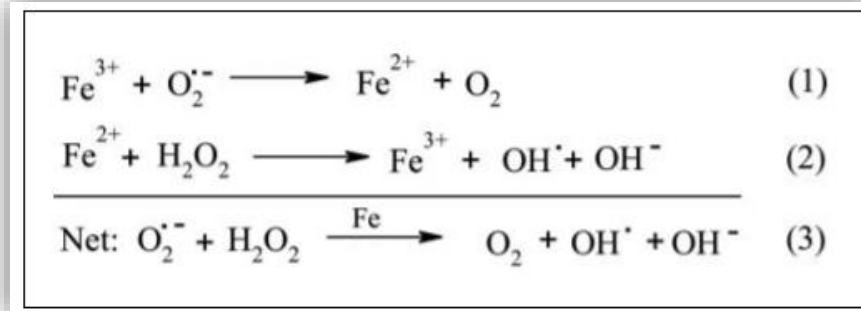
Şekil 1.11. Demir molekülü ile gerçekleşen ROS döngüsü (Modifiye edilmiştir) (Hofer *et al.* 2008)

Fenton tarafından 1894’de yapılan deneylerden sonra, Fenton reaksiyonu olarak bilinen bir reaksiyon yoluyla hidroksil radikalleri ($\cdot\text{OH}$) üretiminde Fe’nin rolü tanımlanmıştır (Şekil 1.12) (Richardson *et al.* 2009).



Şekil 1.12. Fenton reaksiyonu ve demir metabolizması (Richardson *et al.* 2009)

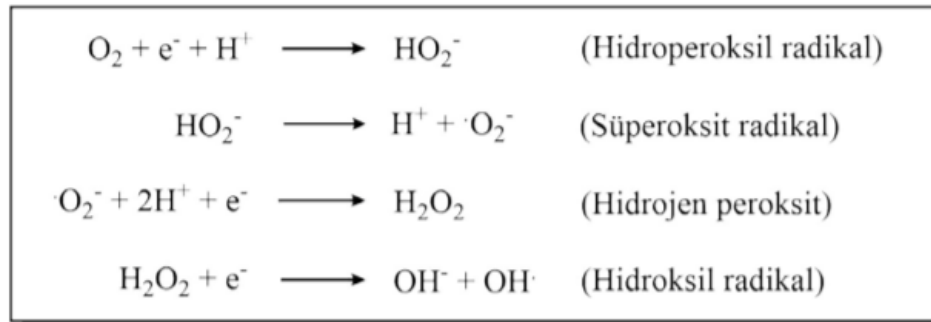
Fenton reaksiyonunu takiben Fe katalizli hidroksil radikalleri ($\cdot\text{OH}$) ve hidroksit anyonu (OH^-) üretimi Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinmektedir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. 1) Süperoksit radikali tarafından Fe (III)'ün indirgendiği, biyolojik öneme sahip olan demirin katalizlenmesi redoks reaksiyonu, 2) Fenton reaksiyonu 3) Haber-Weiss reaksiyonu (Kalinowski and Richardson 2005)

1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal hücrel aktiviteler sonucu meydana gelen bir oksijen formudur. ROS'lar serbest radikaller ve non-radikaller olarak iki gruptan oluşmaktadır. Endojen kaynaklı ROS'lar, süperoksit anyonları, hidrojen peroksit, hidroksil radikali iken ekzojen kaynaklı ROS'lar ise sigara, ozon, hiperoksi, iyonize radyasyon, ağır metaller olarak sayılabilir. Yapısında bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan moleküller serbest radikal, iki radikal eşleşmemiş elektronlarını paylaşan moleküller ise non-radikaller oluşmaktadır. En önde gelen ROS'lar, süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{HO}^{\bullet}$) ve oksijenin kısmi indirgenmesi ile oluşan non-radikal oksijen türleridir (Şekil 1.14) (Birben *et al.* 2012).



Şekil 1.14. Serbest radikallerin oluşum reaksiyonları (Tangvarasittichai 2015)

Bu tür radikaller oldukça reaktiftir ve hücre içerisindeki moleküller ile ilişki kurar. ROS, DNA ve RNA da bulunan fosfodiester bağını yıkarak molekülün zincir yapısını bozmaktadır. Ayrıca hücre içerisindeki diğer bir hedefi ise yağ asitleridir ve bu süreç nekrozis ile membran yapısını bozan lipid peroksidasyonun neden olmaktadır. Özellikle hidroksil radikali, proteinlerin sistein rezidülerine bağlanan enzimler aktive olduğu için, proteinlerin sistein rezidülerindeki SH gruplarını oksidize etmektedir (Muriel and Gordillo 2016). Hücresel ROS'lar endojenik olarak, mitokondrial oksidatif fosforilasyon ya da ksenobiyotik bileşikler gibi ekzojenik kaynaklar ile etkileşiminden oluşabilmektedir. ROS'un hastalıkların oluşmasıyla olan ilgisi makromoleküller de oluşturduğu hasarla sınırlı değildir. ROS sinyallerinin hastalıkların oluşmasında artışa sebep olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Örneğin ROS'ların gen aktivasyonunu ve tümörün metastazını artırdığı görülmüştür (Ray *et al.* 2012).

Ayrıca ROS'lar hücrenin antioksidan sistemine hücum ettiği zaman hem hücredeki ROS seviyesi artmakta hem de hücrenin antioksidan kapasitesinde azalmalara ve oksidatif stresin meydana gelmesine neden olmaktadır.

Oksidatif stresin temeli mitokondriyel respirasyondan kaynaklanmaktadır. Kalp, beyin, böbrek, karaciğer ve iskelet kasları etkin oksijeni süperoksite çevirerek tüketen organlardır. Mitokondriyel elektron taşıma zinciri süperoksit anyonu oluşumunun kaynağıdır ve her mitokondri günlük yaklaşık 107 çeşit ROS molekülü üretmektedir (Tangvarasittichai 2015).

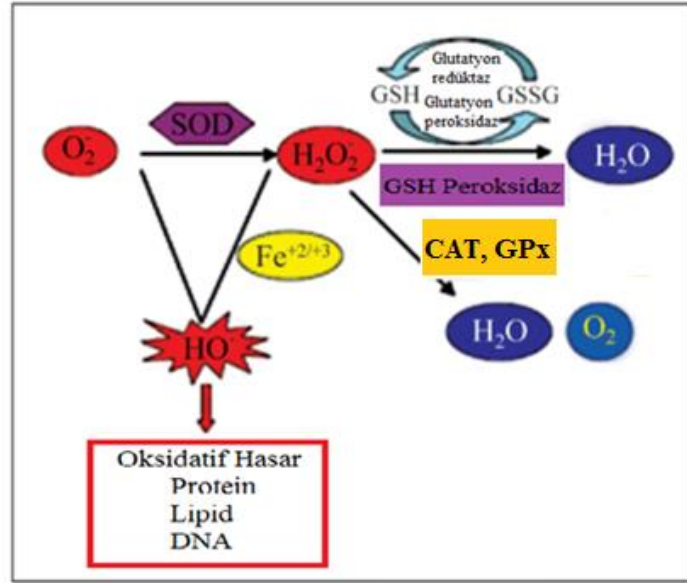
Oksidatif stres, tümör nekrozis faktör-a (TNF- α), interlekin-6 (IL-6), transformasyon büyüme faktörü-B (TGF-B) gibi sitokinlerin zararlı etkilerini artırarak fibrojenize neden olmaktadır (Muriel and Gordillo 2016).

Oksidatif stres, direkt ya da indirekt olarak ROS'ların nükleik asit, lipid, protein gibi makromoleküllerin yapısına zarar vermekte ve organizmada karsinogenez, diyabet, nörodejenarasyon, ateroskleroz ve yaşlanmalara neden olmaktadır. Ayrıca oksidatif stres, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci, adipositokin

disregülasyonu, karsinogenez, nörolojik hastalıklar, diyabet, kansızlık, yaşlanma gibi çeşitli patolojik bulguları kapsamaktadır (Tangvarasittichai 2015).

Hücrelerde mitokondriyal reaksiyonlar sonucu oluşan ve çok miktarda bulunan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (Nox) enzim ailesi, hücrelerde süperoksit ve hidrojenperoksit gibi ROS'lar meydana getirir. Nox memelilerde yedi üye barındıran bir enzim ailesidir. Özellikle Nox1 ve Nox2 (NADPH oksidaz 1 ve 2), hipertansiyon, hiperkolestrol, diyabet ve yaşlanma gibi durumlarda damarlarda ROS oluşturan en büyük kaynaklardır ve bu yüzden oksidatif stresin önde gelen sebebi olarak görülmektedir. NADPH oksidaz çeşitli intraselüler ve ekstraselüler bölümlere biyolojik membran boyunca sitozolden elektron transferini katalizlemektedir. Nükleus, mitokondri gibi organellerde eksprese olan NADPH oksidaz biyolojik membran üzerine bağlanmaktadır. Sitozolik NADPH bütün NADPH oksidazların izoformları için bir elektron donörü olarak iş görmektedir. Oksijen her zaman son elektron alıcısı olarak davranmaktadır. Nox1, Nox2 ve Nox5 oksidaz enzimi oksijene elektron transfer ederek süperoksit radikallerinin oluşmasını sağlamaktadır. Diğer Nox ailesi üyesi enzimler ise süperoksit anyonu yerine öncelikli olarak oksijene elektron transfer ederek hidrojen peroksit oluşturmaktadır (Drummond *et al.* 2011).

Hücrelerde oksidatif stres durumunda ROS'ların nötralize edilmesini sağlayan antioksidan sistem olarak adlandırılan bir savunma mekanizması bulunmaktadır. Bu sistem serbest radikallerin ilk adımı olan süperoksit anyonunu, düşük reaktifliğe sahip olmasına rağmen süperoksit dismutaz (SOD) olarak adlandırılan spesifik bir enzim ile hidrojen peroksit'e dönüştürmektedir. SOD bütün aerobik hücrelerde eksprese olmaktadır. SOD, iki molekül O_2^- radikali ile etkileşime girerek hidrojen peroksit oluşturmaktadır ve bu molekül bir diğer reaksiyon için bir elektron donörü olarak kullanılmaktadır. Bu aşamada ise hidrojen peroksitten suya kadar uzanan reaksiyon zincirini katalizleyen diğer enzimler ise katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazdır (GPx) (Şekil 1.15) (Galaris and Pantopoulos 2008).

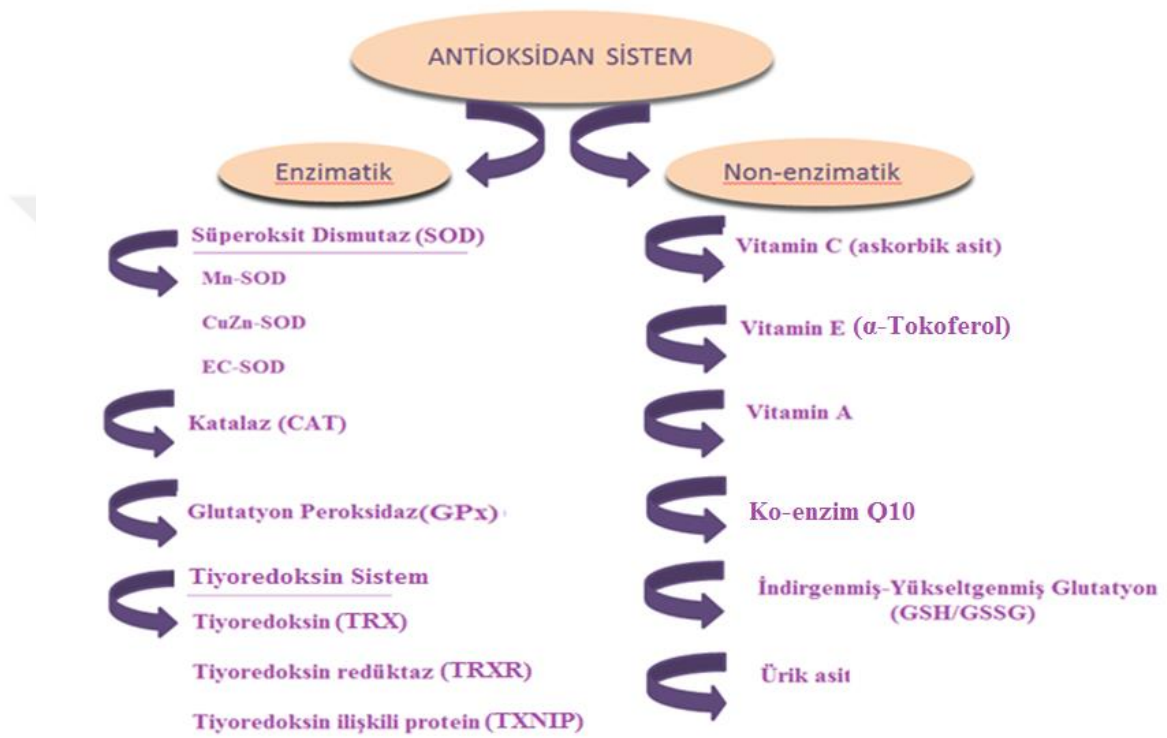


Şekil 1.15. Serbest radikallerin oluşumu ve hücreye verdiği hasar (Wakamatsu *et al.* 2008)

1.5. Antioksidan Savunma Sistem

Reaktif oksijen türleri (ROS), gerek hücrel aktivitelere gerekse hava kirliliği, sigara gibi çevresel faktörlere maruz kalmadan dolayı organizmada üretilmektedir. Ancak hücrede ROS miktarı normal seviyeden fazla olursa organizmadaki oksidan ve antioksidan arasındaki denge bozulur ve bu da oksidatif stres oluşumuna neden olur. ROS oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için organizma antioksidan sistem olarak tanımlanan bir savunma sistemi geliştirmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerine bağlanarak lipid peroksidasyonu inhibe etmektedirler. Antioksidanların etki mekanizmaları, serbest radikallere bağlanarak ya da daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek, serbest radikalle etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım sağlayarak göstermektedirler (Durmuş and Radikalleri 2005). Organizmada hasar verici prooksidanlara karşı kompleks yapıda olan enzimatik antioksidanlar ve non-enzimatik antioksidanlar bulunmaktadır (Şekil 1.16.) (Reuter *et al.* 2010). Aerobik organizmalar, ROS'ların zararlı etkilerinin yok edilmesinde rol oynayan, enzimatik ve non-enzimatik

antioksidanlarla devamlı etkileşim halindedir (Şekil 1.16). Fakat kanser, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, astım, hipertansiyon, çeşitli kalp hastalıkları gibi bazı patolojik durumlarda antioksidan sistem baskılanmaktadır (Birben *et al.* 2012).



Şekil 1.16. Antioksidan savunma sistem (Modifiye edilmiştir) (Birben *et al.* 2012)

1.5.1. Non-enzimatik antioksidanlar

Düşük molekül ağırlıklı enzim olmayan antioksidanlardır. Vitamin C, A, E, ürik asit, koenzim Q10, indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyon (GSH/GSSG) non-enzimatik antioksidanlardır (Birben *et al.* 2012).

1.5.1.a. Vitamin C (Askorbik asit)

Suda çözünebilen C vitamini, intraselüler ve ekstraselüler sulu alanlarda serbest radikalleri parçalayarak bir antioksidan görevi görmektedir. İlerleyen yaşla birlikte plazmadaki seviyesinde azalma meydana gelmektedir. Aynı zamanda E vitamini kökenli oluşan serbest radikallerin tekrar E vitamene dönüşmesini sağlamaktadır (Birben *et al.* 2012).

1.5.1.b. Vitamin A

A vitamini, karaciğerde üretilen karotenoid ve β -karotenin parçalanması ile oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonuna sebep olmadan önce peroksil radikalleri ile etkileşimi ile antioksidan sistemde rol almaktadır. Ayrıca göze, deriye ve iç organlara yararlı etkisi ile de bilinmektedir (Mehta and Gowder 2015).

1.5.1.c. Ko-enzim Q10

Co-enzim Q10, lipit peroksil radikallerinin oluşumunu önlemektedir ve bu radikaller oluşmuş olsa dahi onları nötralize edebilmektedir. C vitaminine kıyasla co-enzim Q10, E vitaminin yenilenmesini daha fazla katalizlemektedir. Hücre yenilenme sürecinde önemli rol oynar ve bütün hücrelerde mevcuttur (Turunen *et al.* 2004).

1.5.1.d. Ürik asit

Ürik asit, insanlarda pürin nükleotid metabolizmasının son ürünüdür. Böbreklerden filtrasyon sonrası vücut tarafın %90 oranında geri emilimi sağlanmaktadır ve vücut için önemli fonksiyonlarda rol almaktadır. Serbest radikallerin parçalanmasında ve peroksidasyon tarafından eritrositlerin lizisini ve peroksidazlar ile hemoglobinin reaksiyonu sonucu oxo-hem oksidazların aşırı üretimini engellemektedir (Kand'ár *et al.* 2006).

1.5.1.e. İndirgenmiş/Yükseltgenmiş glutatyon (GSH/GSSG)

Glutatyon, serbest radikallere bir molekül hidrojen ya da elektron vererek hücreleri koruyan bir endojen tripeptittir. Ayrıca askorbat gibi diğer antioksidanların yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır (Mehta and Gowder 2015; Steenvoorden and van Henegouwen 1997). Ancak bu endojen kaynaklı antioksidanlar insanlarda serbest radikallerin nötralizasyonun da yeterli olmaz ve diyetle diğer antioksidanların alınması gerekmektedir (Mehta and Gowder 2015).

1.5.1.f. Vitamin E

E vitamini lipid içerisinde çözünebilen, dokularda, alyuvarlarda ve plazmada bulunan önemli bir antioksidandır. Moleküller arası bağları koparma yeteneğinden dolayı lipid moleküllerinin iç yapılarını korunmasını sağlamaktadır. Tokoferoksil radikallerini oluşturan peroksil radikallerine fenolik hidrojen molekülünü ekleyerek lipid peroksidasyonunu engellemektedir (Halpner *et al.* 1998; Mehta and Gowder 2015).

1.5.2. Enzimatik antioksidanlar

Enzim özelliğinde olan enzimatik olarak serbest radikallere bağlanan ve suda çözünerek sitoplazmadaki serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidanlardır (Hamid *et al.* 2010). Karaciğerde bulunan en önemli antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) dır. Bunlara ek olarak diğer önemli antioksidan savunma sistemi enzimleri, hem oksigenez-1, tiyoredoksin (TRX), peroksiredoksin (PRX) gibi redoks proteinleridir (Birben *et al.* 2012).

1.5.2.a. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının hidrojen peroksik (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizler. Memeli dokularında süperoksit dismutaz

enziminin 3 formu bulunmaktadır. SOD'un farklı formları farklı dokulara dağıtılmakta ve her birinin spesifik subselüler lokasyonu bulunmaktadır (Mehta and Gowder 2015).

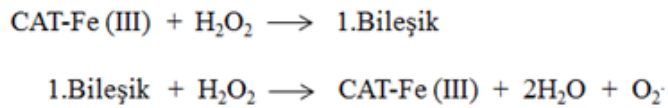


Şekil 1.17. Süperoksit dismutaz enzim reaksiyonu

Manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD), mitokondrinin matriksinde lokalize olmuştur. Ekstraselüler süperoksit dismutaz (EC-SOD), genellikle kollajen liflerinin bulunduğu bölgelerde, sistemik kanalların ve damarların etrafında lokalize olmuştur. Bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZn-SOD) ve Mn-SOD süperoksit radikallerinin toplayan moleküller olarak görev yapar. EC-SOD karaciğer hücreleri arasında ekstraselüler matriks bölümlerine spesifik bağlanmalar yapar ve karaciğerin korunmasını sağlamaktadır (Birben *et al.* 2012).

1.5.2.b. Katalaz (CAT)

Katalaz, antioksidan savunma sistemi enzimleri arasında tanımlanan ilk enzimdir ve hidrojen peroksiti suya ve oksijene 2 basamakta dönüştürmektedir. Bu işlemi yaparken demiri ve manganee kofaktör olarak kullanmaktadır.



Şekil 1.18. Katalaz enzim reaksiyonu

Katalaz dört alt birimden oluşan bir proteindir ve her bir alt birim bir hem grubu ve bir molekül NADPH içermektedir. Katalaz genelde karaciğer hücrelerindeki peroksizomlarda lokalize olmaktadır (Birben *et al.* 2012).

1.5.2.c. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon sistem, indirgenmiş glutasyon (GSH), glutasyon peroksidaz (GPx), yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) ve glutasyon S-transferaz (GST)'dan oluşmaktadır. Glutasyon peroksidaz dört selenyum molekülünü kofaktör olarak kullanan ve hidrojen peroksitin parçalanmasını katalize eden enzimdir. İhtiyaç durumunda dokulara dağıtılmasına rağmen çoğunlukla karaciğer hücrelerinde bulunmaktadır. Glutasyon S-transferaz, lipid peroksidazlara yüksek aktivite gösterir. Bu enzimler çoğunlukla karaciğerde bulunmaktadır. Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit gibi ROS'lara substrat olan glutasyonun oksidize olmasını katalizlemektedir. Ayrıca GSH/GSSG oranı önemli bir oksidatif stres belirteçidir (Takahashi and Cohen 1986; Birben *et al.* 2012).



Şekil 1.19. İndirgenmiş glutasyon (GSH) reaksiyon

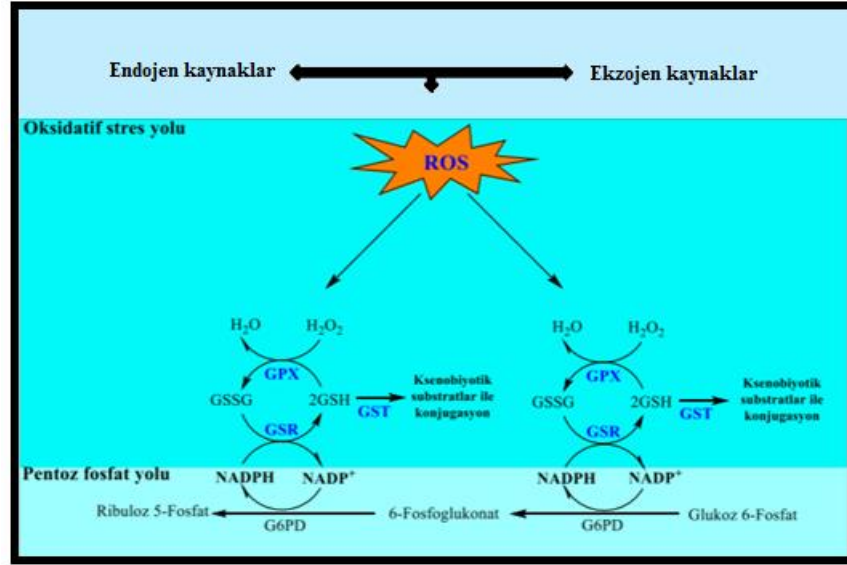
Glutasyon peroksidaz subselüler (mitokondri ve sitoplazma) alanlarda hidrojen peroksitin ana parçalayıcı molekülü olarak bulunmaktadır. Glutasyon peroksidaz enziminin bu aktivitesi indirgenmiş glutasyon (GSH) varlığında gerçekleşmektedir (Holben and Smith 1999; Mehta and Gowder 2015).



Şekil 1.20. Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) reaksiyonu

Glutasyon sistem enzimlerinin redoks değişimleri, pentoz fosfat yolu ile açığa çıkan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) tarafından sağlanmaktadır (Şekil 1.22). İndirgenmiş glutasyon (GSH), flavin nükleotid bağımlı enzimdir ve glutasyon peroksidaz gibi ihtiyaç halinde dokulara dağıtılmaktadır. Glisin, glutamat, sistein gibi

amino asitler glutatyonun sentezinde kullanılmaktadır. Glutatyon sistem enzimleri suda çözünebilen önemli antioksidanlardır ve direkt olarak ROS'ları nötralize etmektedir. Glutatyon bu nötralizasyon işlemi esnasında C vitamini ile etkileşim halindedir (Mehta and Gowder 2015).

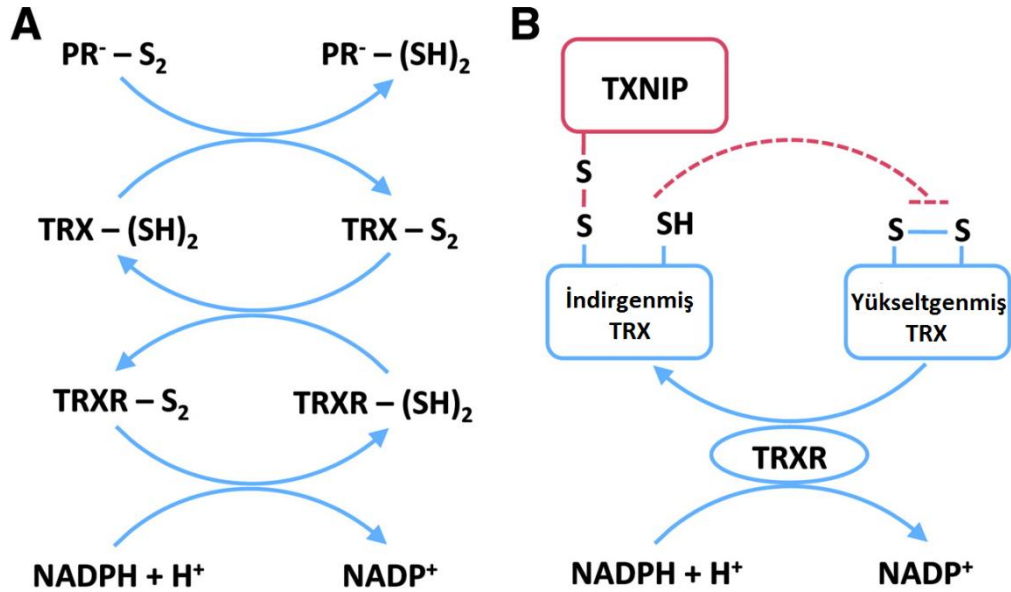


Şekil 1.21. ROS'ların enzimatik antioksidanlar tarafından nötralize edilmesi (Modifiye edilmiştir) (Budak *et al.* 2014a)

1.5.3. Tiyoredoksin sistem

Tiyoredoksin sistem, tiyoredoksin (TRX), tiyoredoksin redüktaz (TRXR) ve NADPH içeren, oksidatif stres durumunda ilgili enzimlere elektron transportunda, redoks dengesinde, apoptozun düzenlenmesinde, DNA sentezinde ve antioksidan sistemde önemli rol oynayan bir disülfid-redüktaz sistemidir (Lu and Holmgren 2014).

Tiyoredoksin sistem, TRX nakavt farelerde embriyonik lateldir ve bu sebeple yaşam için esansiyeldir. TRX sistem enzimleri selenyum bağımlı enzimlerdir. TRXR, elektron donörü olarak NADPH kullanmaktadır ve TRX aktivasyonunu sağlamaktadır. TRX'nin bu redoks döngüsü, endojen bir inhibitör olan tiyoredoksin ilişkili protein (TXNIP) ile düzenlenmektedir (Şekil 1.21) (Dunn *et al.* 2010).



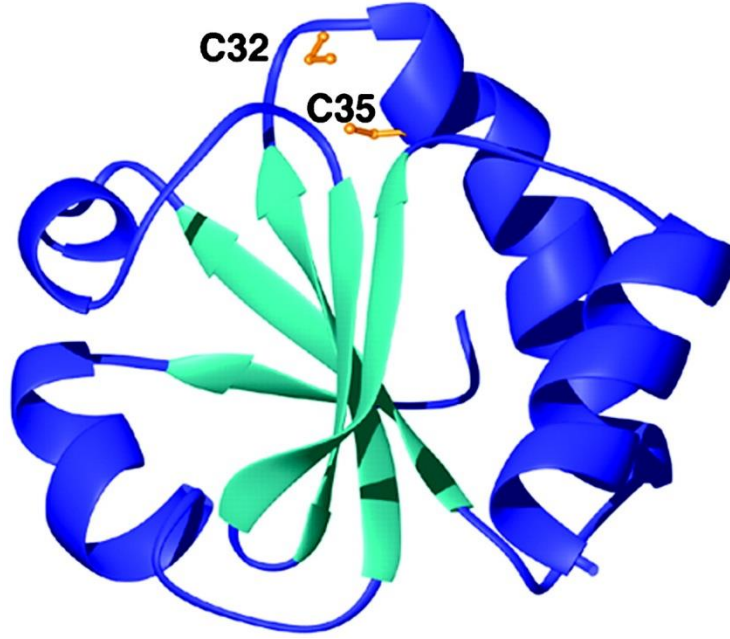
Şekil 1.22. A) Yükseltgenmiş TRX (TRX-S₂) ve indirgenmiş TRX (TRX-SH₂). NADPH kullanılarak, TRXR aracılığıyla TRX'in indirgenme/yükseltgenmesi ve hedef proteinin TRX ile redükte edilmesi, **B)** TXNIP, indirgenmiş TRX ile disülfid bağı kurarak TRX'i inhibe etmesi (Dunn *et al.* 2010)

1.5.3.a. Tiyoredoksin

Tiyoredoksin (Trx, Txn) insanlarda 9.kromozomda lokalize olmuş, 5 ekzon bölgesi bulunan ve mRNA seviyesinde 508 baz çiftinden oluşan, protein halinde 12 kDa olan bir dithiol proteindir (Dunn *et al.* 2010). İlk olarak 1964'de *E.coli* de yapılan bir çalışma esnasında kimliklendirilmiş, daha sonra bir Japon grubu HTLV-1 ile enfekte edilen T hücrelerinde yaptıkları çalışmada ise insanda olan TRX'i saptamıştır (Hisabori and Hara 2013).

Moleküllerin oksidatif stres durumunda katalitik aktif bölgeleri ile etkileşime geçerek, disülfid/dithiol değişimlerini katalizlemektedir. Sitozolik TRX1 ve mitokondriyal TRX2, Trp-Cys-Gly-Pro-Cys amino asitlerinden oluşan aktif bölge içermektedir. İnsan TRX1, Cys₃₂ ve Cys₃₅ aktif bölgeleri dışında pozisyon 62, 69 ve 73 olan üç Cys residüzü içeren 105 amino asite sahiptir (Şekil 1.23). Oksidatif stres koşulları altında Cys₆₂ ve Cys₆₉ TRX-S₂ ikinci bir disülfid bağı oluşturmaktadır. Bu iki TRX-S₂ bağı, zayıf bağ olarak

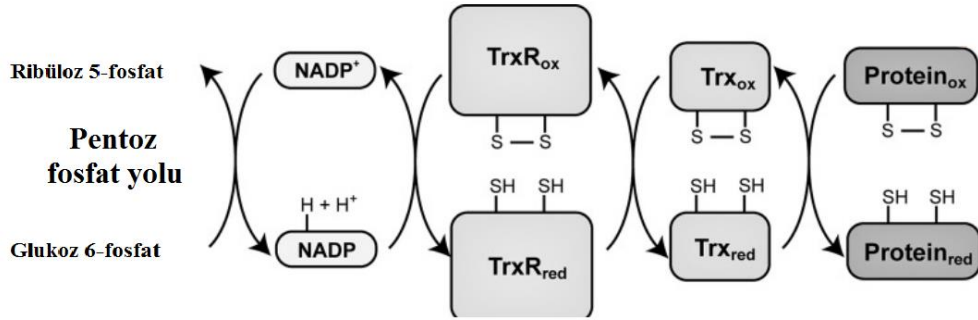
karakterize edilir, ancak TRXR ile direkt indirgenemez ve TRX1'i inaktive etmektedir. Bu ekstra Cys rezidülerinin oluşumundan TRX1'in S-nitrolizasyon, dimerizasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarının etkili olduğu tespit edilmiştir (Lu and Holmgren 2012).



Şekil 1.23. TRX'in 3 boyutlu yapısı (Kumar *et al.* 2004)

TRX'in kristal haldeki yapısı birçok kez çözümlenmiştir. TRX üç α -heliks ile çevrelenmiş dört β -kırmalı iplikten oluşmaktadır. N-terminalinde ek olarak bir α -heliks ve β -kırmalı iplikçesine sahiptir. TRX, 32 ve 35 pozisyonundaki sisteinleri reaksiyona girmek için kullanılmaktadır. İlk olarak N-terminal sistein disülfid üzerinde nükleofilik bir saldırı başlatır ve substratın proteine bağlanması ile karışık bir disülfid bağının oluşmasını katalizlemektedir. İkinci aşamada orta moleküller arası disülfid bağı üzerinde TRX'in C-terminal sisteininin nükleofilik saldırısıdır ve oksitlenmiş TRX'de bir disülfid bağı oluşması ve indirgenmiş substrattaki disülfid bağı kırılması ile sonuçlanmaktadır. TRX daha sonra bir elektron donorü olarak, pentoz fosfat yolu tarafından üretilen NADPH'ı kullanan TRXR tarafından aktive edilmektedir. Oksidatif stres ile ilişkili redoks süreçlerinde kilit bir düzenleyici olarak işlevine ek olarak, TRX'in son zamanlarda nitrozatif stresin düzenlenmesinde de rol oynadığı tespit edilmiştir. ROS'a

benzer şekilde, reaktif nitrojen türleri, bazı hücrel sinyal yolları için zararlı olan nitrojen kimyasallar üretmektedir (Lee *et al.* 2013).



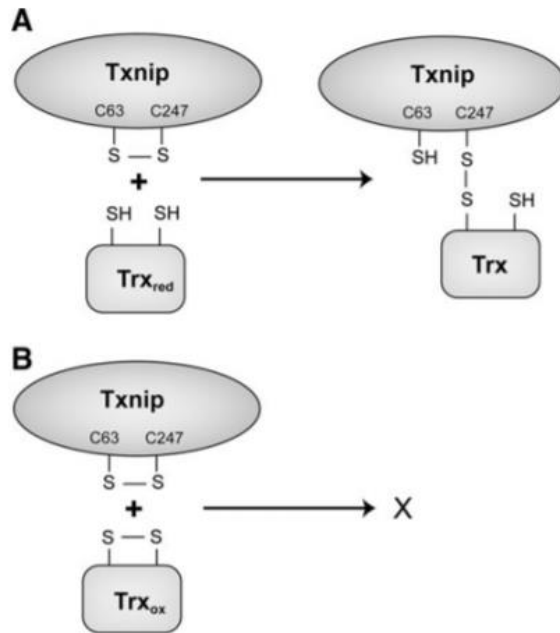
Şekil 1.24. TRX sistemin redoks döngüsü (Lee *et al.* 2013)

1.5.3.b. Tiyoredoksin redüktaz

Selenyum içeren ve güçlü bir antioksidan olan tiyoredoksin redüktaz (TRXR), ilk olarak 1996'da insan T hücrelerinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Holben and Smith 1999). Memelilerde tanımlanmış 55 kDa olan, sitoplazmik TRXR1 ve mitokondriyal TRXR2 nakavt fareler embriyonik lateldir (Dunn *et al.* 2010). Bütün memeli TRXR'ler C-terminal bölgesinden bir selenosisteine (SEC) bağlanır ve Gly-Cys-SeCys-Gly içeren aktif bölgesi bulunan selenoenzim olur. SEC, çoğu zaman durma kodonu olarak görev yapan UGA ile genetik olarak kodlanan 21.aminoasit olarak bilinmektedir. Selenyum eksikliğinin sıçan karaciğeri TRXR'de SEC in Cys ile yer değiştirmesine neden olduğu belirlenmiştir (Lu and Holmgren 2012).

özellikler ışığında α -arrestinin TXNIP'in redoks sinyallerini diğer metabolik yollar ile birleştirilmesinde merkezi rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte 1994'deki ilk tanımlamadan bu yana, TXNIP'in redoks sinyallerinde metabolizmaya ve hücre döngüsünün düzenlenmesine kadar değişen çeşitli biyolojik yolların geniş bir yelpazesinde düzenleyici rol aldığı belirlenmiştir (Lee *et al.* 2013).

TXNIP'in TRX'in işlevini ve etkisini inhibe etmesi iki şekilde olmaktadır. Birincisi TXNIP TRX'i bağlar ve TRX'i ilişkili olduğu proteinlerden uzaklaştırarak bir rekabetçi inhibitör olarak gerçekleştirmektedir. İkincisi ise oksidatif stres sonucu TXNIP ekspresyonundaki artış TRXR aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır ve dolayısıyla TRX aktivitesi gerçekleşmemektedir. TXNIP-TRX kompleksindeki artış, oksidatif stres durumunda hücrede oksidize proteinlerin artmasına sebep olmaktadır. TXNIP, TRX'in aktif Cys₃₂ rezidüsü ve TXNIP'in Cys₂₄₇ aktif rezidüsü arasında bir disülfid bağı oluşturarak TRX ile TRXR'in etkileşime girmesine engel olmaktadır. Redoks bağımlı olarak gerçekleşen bu etkileşim sadece TXNIP'in oksidize formu ile TRX'in redükte formu arasında gerçekleşmektedir (Şekil 1.26) (Spindel *et al.* 2012).



Şekil 1.26. TXNIP-TRX ilişkisi **A)** TRX'i indirgeyerek TXNIP aktive olur ve TRX'i inaktive eder, **B)** Oksidize haldeki TRX ve TXNIP arasında disülfid değişim reaksiyonu mümkün değildir (Lee *et al.* 2013)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Demir canlıların çoğu için yaşamsal öneme sahip bir biyoelementtir. Memeli hücrelerinin metabolik ihtiyaçlarını karşılamak ve özel bazı işlevlerini yerine getirmek için demir elementine ihtiyaç vardır. Esnek koordinasyon yapısı ve redoks reaktivitesine bağlı olması demirin, proteinlerle ilişki kurmasına, oksijen bağlaması, elektron transfer etmesi ve katalitik reaksiyonları yönlendirebilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle neredeyse tüm hücreler oksijen transportu, enerji metabolizması ve DNA sentezi gibi temel biyokimyasal işlevler için demiri kofaktör olarak kullanmaktadır (Aisen *et al.* 2001).

DNA metabolizmasında görev alan kritik enzimler (helikaz, nukleaz, glikosilaz ve ribonükleotid redüktaz) demiri bir kofaktör olarak kullanır. Son yapılan çalışmalarda aktif ve stabil kompleks oluşturmak için demir-sülfür (Fe-S) molekülünü bağlayan korunmuş zengin sistein motiflerinin bulunduğu DNA polimerazın katalitik alt ünitesinin açığa çıkarılması çarpıcı bir gerçek olarak ortaya konmuştur. Buna paralel olarak, mitokondriyal ve sitoplazmik olarak meydana gelen Fe-S eksikliği DNA sentezinde görevli olan nükleer demir gerektiren enzimlerin eksikliği sonucu DNA hasarı ve genom instabilitesine neden olur. Son çalışmalar maya hücrelerinde en iyi deoksiribonükleotid konsantrasyonunu korumak için demir kullanımında meydana gelen dalgalanmaları düzenlemek için ribonükleotid redüktaz fonksiyonunu düzenleyen çok katmanlı mekanizmalara sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca DNA onarım mekanizması bileşenlerinde bulunan redoks aktif Fe-S merkezlerinin, çift şeritli DNA ile genom boyunca DNA uyumsuzluklarını tespit etmek ve onarmak için kritik olduğu gösterilmiştir. Demirin, DNA replikasyonu ve onarımı arasındaki bu beklenmedik bağlantılar kanser, yaşlılık ve diğer DNA ilişkili hastalıkları doğru anlamak için yardımcı olacağı düşünülmelidir (Puig *et al.* 2017).

Son yapılan çalışmalarda canlılar için hayati öneme sahip olan demirin, organizmada fazla miktarda bulunmasının toksik etkilere sebep olduğu gösterilmiştir. Demirin fazla miktarı aerobik koşullarda reaktif oksijen türlerinin çoğalmasına ve Fenton reaksiyonu

olarak adlandırılan hidroksil radikali gibi yüksek reaktif radikallerin oluşumunun katalizlemektedir. Bu olay sonucu oluşan oksidatif stres doku hasarına ve birçok hastalığa sebep olmaktadır (Galaris and Pantopoulos 2008; Budak *et al.* 2014b).

Demir birikiminin organizmada çeşitli hastalıklara sebep olduğu gibi demir eksikliği de organizmada problem olmaktadır. Demir eksikliği, sanayileşme, yetersiz beslenme ve enfeksiyon gibi durumların artmasından dolayı dünya çapında, çoğunlukla kadınlar, yetişkinler ve çocuklar olmak üzere geniş kitlelere ulaşmıştır. Ulusal Sağlık Örgütünün yaptığı son çalışmada 25-49 yaş arası bayanların yaklaşık %46, erkeklerde ise %20 oranında demir eksikliği tespit edilmiştir. Cilt solgunluğu, vücutta güçsüzlük, halsizlik gibi belirtileri vardır (Gozzelino and Arosio 2016).

Hücre içindeki demirin toksit seviyelere ulaşan miktarda birikiminin önlenmesi için dikkatli bir düzenleme mevcuttur. Aşırı demir birikiminin oksijen radikallerinin artışı olarak tanımlanan oksidatif strese neden olduğuna inanılmaktadır. Hücresel demir molekülü her zaman çeşitli moleküllere şelatlı olarak bulunur. Sıçan karaciğerinde NADPH-bağımlı reaksiyonlar üzerinde ferrik kompleksin etkisi araştırılmıştır. Yapılan test sonucu demir şelatlayıcıların lipid peroksidasyonunu artırdığı gözlenmiştir (Puntarulo 2005).

Hücrelerin redoks durumu ağırlıklı olarak demir molekülüne bağlıdır ve fizyolojik sınırlar içinde redoks dengesi sıkıca korunmaktadır. Organizmada demir homeostazisinin korunmasında çoklu fizyolojik süreçler mevcuttur. Bu denge hücre içi ve hücre dışı demir depolarında düzenlenmektedir. Oksidatif stres durumunda demir metabolizmasının ana düzenleyici molekülleri olan ferritin ve hepsidin aşırı eksprese olabilir. Bu durumun sebep olduğu demirin aşırı birikimi, çeşitli kardiyovasküler hastalıklar, kronik inflamatuvar hastalıkları için demir şelasyon tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Demir şelasyon tedavisi vücutta biriken aşırı demirin atılması amacıyla uygulanmaktadır. Kalpte oluşan aşırı demir kardiyomiyopatisi kalbin sistolik ve diyastolik fonksiyonlarında bozulmalara sebep olur. Yapılan çalışmalarda uzun vadede demir şelasyon tedavisinin faydaları belgelenmiştir (Gudjoncik *et al.* 2014).

Günümüzde hepsidin hormonu demir metabolizmasının ana düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Hamp geni tarafından kodlanan hepsidinin aşırı ekspresyonu ile dünyaya gelen hayvanlarda demir eksikliği, aynı zamanda Hamp geni mutasyonu sonucu oluşan hepsidin eksikliğinde ise canlıda demir birikimi meydana geldiği gözlemlenmiştir (Nemeth and Ganz 2006).

Farelerde ve insanlarda yapılan eşzamanlı çalışmalarda idrar, doku ve kandan izole edilen demir seviyesinde oluşan artışın hepsidin miktarının artması neden olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda hepsidin gen bölgesinde meydana gelen bir delesyon sonucu hepsidin eksikliği ve neticesinde şiddetli demir birikimi, aynı şekilde hepsidinin aşırı ekspresyonunun ise demir yetersizliğine neden olduğu tespit edilmiştir (Schmidt 2015).

Ferroportin, organizmadaki demirin hücre içerisinden kana verilmesini sağlayan bir transmembran proteindir. Hücre içerisindeki ferröz (Fe^{+2}) haldeki demiri ferrik (Fe^{+3}) hale dönüştürerek kana vermektedir. Ferroportin-1 mutant Zebra balığında embriyonik hipokromik anemi geliştiği görülmüştür (McKie *et al.* 2000).

Yaşlı ferroportin-1 mutant ise bağırsak ve makrofaj hücrelerinde demir birikimine sebep olmuştur. Bu bilgiler ışığında erken süreçte Fpn-1 mutasyonu embriyonik lateldir (Ward and Kaplan 2012).

Hephaestin membran üzerinde bulunan ferroportin proteinine biyokimyasal olarak afinitesi olan ve transfer edilecek demir biyomolekülünün redoks değişimini sağlayan bir proteindir. Hephaestin yokluğunda bağırsak hücrelerinden kana demir salınımı yapılamadığı için farelerde demir eksikliğine bağlı anemi görülmüştür (Ward and Kaplan 2012).

Karaciğer, sindirim sistemi, detoksifikasyon, protein sentezi ve sindirime yardımcı olan kimyasalların üretimini gerçekleştirmektedir. Karaciğer hücreleri, sindirime yardımcı safra sıvısı üretilmesi, hemoglobinin yıkımı sonucu meydana gelen bilirubinin absorbe

edilmesi ve hemoglobinden yayılan demirin depo edilmesi, yağ ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi, vitamin ve mineral depo edilmesi, proteinlerin yıkımına yardımcı olması, immün aktiviteye sahip olan Kupffer hücrelerinin çoğunu içermesi, ilaç ve alkolün zararlı etkilerini filtrelemesi ve albümin üretilmesi sebebiyle oldukça önemlidir (Muriel and Gordillo 2016).

Karaciğerde hepsidin ekspresyonunu düzenleyen hemojuvelin (Hjv) mutasyonu olan insanlarda ya da Hjv nakavt farelerde hepsidinin olmayışı kadar şiddetli demir birikimi meydana geldiği ve hepsidin yetersizliğinde yaşanan problemlere benzer sonuçlar olduğu tespit edilmiştir (Niederkofler *et al.* 2005).

Seruloplazminin (CP) rolü ilk olarak 1800'lü yılların ortalarında anemi hastası olan genç bir kadının tedavisi yapılırken kandaki demirin hücre içerisine girişini kolaylaştırdığı anlaşılmıştır (Fox 2003). 1900'lü yıllarda ise demir eksikliği durumunda karaciğer ve makrofaj hücrelerinden demir salınımının olması için CP'in rol aldığı tespit edilmiştir (Ward and Kaplan 2012). Farelerde cinsiyete bağlı anemi hastalığının genetik etkisi araştırılırken CP'nin bir homoloğu olarak Hephaestin keşfedilmiştir (Vulpe *et al.* 1999).

Organizmada meydana gelen demir eksikliği veya demir fazlalığı karaciğer, böbrek, beyin, pankreas, kalp gibi hayati organlara zarar vermektedir. Bu organlarda demirin birikimi ve bağırsaklarda fazla demir emiliminden kaynaklanan demir yüklemesi heterojen bir grup ile kalıtılmaktadır. Hemokromatosiz hastalarında dört gende (Hfe, Tfr2, Hjv ve Hamp) mutasyon tespit edilmiştir ve farklı hasta patolojileri incelendiğinde ise ferroportin geninde mutasyon belirlenmiştir. HLA-bağımlı hemokromatosiz ise pankreas, kalp, karaciğer gibi organlarda demir birikimi ile karakterize edilmektedir. Demir dengesinde meydana gelen değişimler karaciğer sirozu, kalp yetmezliği ve diyabetle ilişkilendirilmektedir. Demir birikimi görülen hastaların yalnızca bir kısmında genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu, buna ek olarak bireyin demir yüklemesine genetik olarak duyarlı olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca beyinde oluşan demir eksikliği yaşamın ilk evrelerinde zararlı sonuçlar doğurmaktadır. Demir eksikliği

miyelinsasyonda, nöral ağlarda ve nörotransmisyonun kimyasal olarak değişimine neden olmaktadır. Demir metabolizması ile nöral fonksiyonlar ve nörodejenerasyon arasında çok yönlü bir bağ olmasına rağmen beyindeki demir metabolizmasının temel yanları hala anlaşılamamıştır. Sonuç olarak hücrel demir homeostazisi ve sistemik demir homeostazisi içindeki bilgi kombinasyonu bizlere demirin, hücre tipinemi özgü ya da organa mı özgü olarak entegre olduğunu anlamamıza yardımcı olacaktır ve canlılardaki demir metabolizmasının araştırılması kesinlikle eskimeyecek bir konu olarak değerini korumaktadır (Hentze *et al.* 2004).

Demir metabolizmasında rol oynayan genlerin mutasyonu sonucu meydana gelen genetik kaynaklı en iyi bilinen hastalık kalıtsal hemokromatoz (herediter hemokromatozis (HH)) dir. HH'nin farklı tipleri vardır ve mutasyona uğrayan genin çeşidine bağlı olarak fenotipde görülme şiddeti değişmektedir. HH'nin neredeyse bütün tiplerinde karaciğer, kalp, böbrek gibi dokularda demir birikimi meydana gemektedir ve tedavi edilmezse multiorgan yetmezliği ile sonuçlanmaktadır. Genelde bu hastalığa yakalananların %80'i yetişkinlerdir (Silvestri *et al.* 2014).

Hücre membranında yer alan HJV mutasyonunda BMP sinyallerinde azalmalar ve HAMP geni yokluğunda meydana gelen hemakromatozis görülmektedir (Babitt *et al.* 2006)

Sisplatin ve demir metabolizması ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada Sisplatine dirençli ve sisplatin duyarlı tümör hücrelerinin gelişmesi 80 adet erkek mesane kanserli Rat'larda in vivo olarak araştırılmıştır. Ayrıca deneysel hayvanın kanında ve tümörlü dokuda serbest demir içeriğinin ve seruplazmin (CP) aktivitesinin tespiti, oksidatif stres belirteçleri olan süperoksit, oksidize NADPH aktivitesi düzenleyen nitritoksitin tespiti amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda dirençli hayvanlarda daha fazla olması ile birlikte kanda ve tümörde maksimum demir birikimi tespit edilmiş ve bu molekülün tümörün latent fazında serbest radikallerin oluşumuna karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde sisplatin dirençli hayvanlarda ise antioksidan sistem bozukluğunun sonucu olarak CP oranında artış ve buna bağlı olarak organizmada serbest demir miktarında artış tespit edilmiştir (Chekhun *et al.* 2014).

Son yapılan çalışmalar sonucunda demir eksikliği ile meydana gelen anemi hastalığı için yeni oral ve intravenöz yolla çeşitli tedaviler tanımlanmıştır. Ancak uygulanan tedavilerin uzun vadede doku ve organlarda demir birikimine neden olabileceği belirlenmiştir (Arlet *et al.* 2013).

Organlara ulaşan demir seviyesi azaldığı ve demir depoları tükendiği zaman meydana gelen demir eksikliği orta ve yüksek seviyede anemi ile sonuçlanmaktadır. Tedavi olarak gende meydana gelen mutasyona sonucu eksik olan molekülün eşitline bağlı olarak ilaç veya belirli zaman aralıklarında yapılan demir takviyesi ile yapılmaktadır. Kanser hastalarında ise kanser hücresinin proliferasyonun her evresinde organizmada demir seviyesi değişmektedir. Ayrıca kanser hastalarında uygulanan tedaviler ve kemoterapi sonucu demir metabolizmasında bozulmalar ve anemi görölmektedir. Bazı tümörler ise dokularda demir birikimine neden olur ve buda dokularda demir birikimi sonucu ROS oluşumuna sebep olmaktadır. ROS'lar bazı metastaz proteinlerinin epigenetik düzenlenmelerini değiştirmektedir (Gozzelino and Arosio 2016).

Demir eksikliği anemisinde serum ferritin oranı belirleyicidir. Litrede 100 µg'nin altında ferritin oranı demir eksikliği anemisine işarettir. Demir eksikliği anemisi olan hastalar demir takviyesi almalıdırlar. Ayrıca ortaya çıkan veriler, emilmeyen demirin bağırsak mikrobiyotasında bulunan patojenlerin konsantrasyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Demir eksikliğinin anemi gelişmeden önce tedavi edilmesinin yararı henüz belirsizdir. Tedavi için, intravenöz demir uygulaması faydaları risklerinden daha ağır baştığı durumlarda uygulanmalıdır Demirin uzun süreli biyolojik etkileri, oksijen radikalleri, enfeksiyona karşı duyarlılık gibi olumsuz etkileri hala tartışılmaktadır. (Camaschella 2015).

Tip 2 diyabet (T2DM) hastalarında görölen anemide demir taşıma proteininin rolü hala tespit edilememiştir. Demir eksikliği anemisi (IDA) olan hastalarda olmayanlar ile karşılaştırıldığında DMT1, FPN1, TFR miktarlarındaki değişim araştırılmıştır ve T2DM ve demir eksikliği anemisi olan hastalarda duodenal demir transport protein

ekspresyonu, kronik inflamasyon veya diyabet nedeniyle vücut demir depolarına bağımlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Broide *et al.* 2018).

2010 yılında farelerde yapılan demir yüklemesi çalışmasında Bmp-6 ekspresyonu karaciğerde artarken, bağırsakta değişmediği tespit edilmiştir (Kautz *et al.* 2011).

Budak *et al.* tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada karaciğer dokularındaki glutatyon (GSH) seviyesinin non-toksik demir konsantrasyonu varlığında önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ancak GSH seviyesinde doz-bağımlı azalış uzun süreli demir toksisitesi ile görülmüştür. GSH seviyesinde 30 ppm konsantrasyonda azalışa rastkanırken, 3 ve 300 ppm konsantrasyonlarda değişiklik gözlenmemiştir (Budak *et al.* 2014a). Valko *et al.* 2007 yılında kolon ve meme kanseri hastalarının kanlarında yaptığı çalışmada GSH/GSSG oranının kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede azalış gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Valko *et al.* 2007).

Veuthey *et al.* (2008) ve arkadaşları, anemili farelerde DMT1, Ferroportin ve Hepsidin proteinlerinin böbrekte ekspresyonunu incelemişlerdir. Bazal medulada hepsidin ekspresyonunun aşırı derece azaldığını, ferroportin ve DMT1 ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak böbrekde şiddetli anemi hastalığı varlığında ferroportin ve DMT1 ilişkisinde zayıflama ve hepsidin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Böbrek dokusundaki bu demir birikiminin ise diğer böbrek rahatsızlıklarına neden olabileceği belirlenmiştir (Veuthey *et al.* 2008).

Zainal *et al.* (1999) yaptığı çalışmada ferrik nitritriasetatı (Fe-NTA) intraperitoneal olarak verdiği fare ve sıçanlarda demirin serbest radikal ve böbrek dokusunda kansere neden olduğunu tespit etmiştir. Protein karbonil içeriğinde ve lipid peroksidasyonunda önemli derecede artış tespit edilmiştir. Akut nefrotoksisite durumdan Fe-NTA'nın mitokondriyal ve nükleer oksidatif strese neden olduğu ve demir kaynaklı hücresel hasara neden olduğu belirlenmiştir (Zainal *et al.* 1999).

Böbrek, elektrolitlerin düzenlenmesi, kanda asit baz dengesinin düzenlenmesi, kan basıncının kontrolü, hormon üretimi, su, amino asit ve glikozun geri emilimi gibi fonksiyonları ile memelilerde hayati öneme sahip kompleks bir organdır. Böbreğin temel yapısal ve fonksiyonel birimi nefrodur. Toksik metaller (pestisitler, herbisitler, tıbbi olarak kullanılan çeşitli ilaçlar) ya da gen ve protein seviyesinde meydana gelen kalıtsal hasarlar nefronların fonksiyon kaybının temel nedenleridir (Budak *et al.* 2014b).

Kronik böbrek hastalıklarında demir düzenleyicisi olan hepsidinin rolünü araştıran bir grup, yaptığı deneyle sonucunda hepsidin miktarında artış tespit etmiş ve bu durumun eritropoietin direncinde ve demir dengesinin kontrolünde yeni bir biyomarkır olabileceğini belirtmiştir (Zaritsky *et al.* 2009).

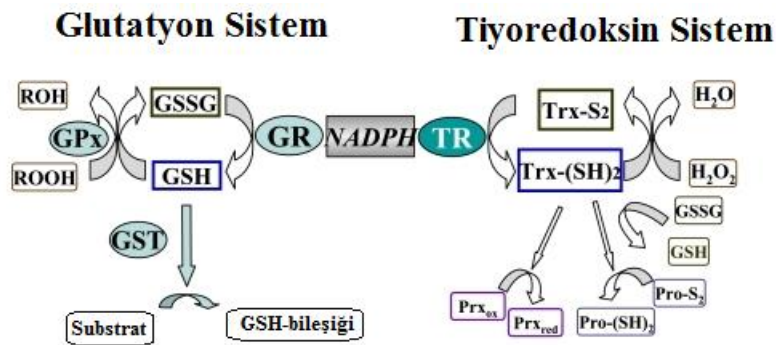
Bir grup araştırmacı tarafından yapılan çalışma sonucunda kronik böbrek hastalığına sahip bireyler introvenöz demir aldığı zaman oksidatif stres oluştuğu belirlenmiştir. Ancak oluşan bu oksidatif stres ile böbrek hastalığının arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca transferrin reseptörlerinde tam doygunluk meydana gelmediği zaman böbrek dokusunda hızlı bir şekilde oksidatif stres oluştuğu tespit edilmiştir (Agarwal *et al.* 2004).

Biyolojik mekanizmaların devamlılığını sağlayan sistemler redoks kontrol sistemleridir. En önemli redoks kontrolünü tiyoredoksin (TRX) ve tiyoredoksin redüktazdan (TRXR) oluşan Tiyoredoksin sistem sağlamaktadır. Bu iki molekül birlikte gen ekspresyonunun redoks düzenlemelerini, anti-apoptotik fonksiyonları, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin kontrolü, proliferasyonu, sinyal iletimi ve oksidatif strese karşı organizmanın korunması gibi önemli biyokimyasal olayların düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu özelliklerinde dolayı Tiyoredoksin sistem özellikle kanser gelişimiyle yakından ilişkili tutulmuştur. Malign tümörlerde Trx'in aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir (Lincoln *et al.* 2003).

Yapılan araştırmalarda karaciğer dokusunda çeşitli ilaçlar, enfeksiyon, dış maruziyetler ve doku yaralanmaların ROS oluşumunu tetiklediği gözlenmiştir. Hücre içerisinde

oluşan ROS'lar DNA, RNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Bu dokuda meydana gelen herhangi bir hasar ağır problemlere hatta ölüme neden olabilmektedir. Tiyol redoks proteinleri (Tiyoredoksin sistem), NAD/NADP, fosforilasyon/defosforilasyon sistemleri karaciğerin oksijen radikallerini nötralize ettiği başlıca sistemlerdir (Muriel and Gordillo 2016).

Tiyoredoksin sistem ve Glutasyon sistem antioksidan sistemin iki önemli koruyucu sistemidir. Bir grup araştırmacı oksidatif stresin sebep olduğu yaşlanma, Alzheimer gibi dejeneratif sonuçlara sebep olan 4-hidroksinonenalının (HNE) varlığında Glutasyon sistem ve Tiyoredoksin sistemdeki değişimleri araştırmıştır. Yapılan deneyler sonucu Glutasyon sistem enzimi olan glutasyon redüktazda (GR) bir değişim tespit edilememiş ancak Tiyoredoksin sistem enzimi olan tiyoredoksin redüktazda (TRXR) önemli derecede yükselme tespit edilmiştir (Şekil 2.1) (Noguchi 2008).



Şekil 2.1. Oksidatif strese karşı iki ana koruyucu sistem (Glutasyon Sistem ve Tiyoredoksin Sistem) (Noguchi 2008)

Tiyoredoksin sistem, hem DNA onarımında, hem de sentezi için deoksiribonükleotid üretiminde rol oynamaktadır. Mitokondride ve sitozolde bulunan TRXR bir selenoenzimdir. Bu enzim geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir ancak kemoterapik ilaçların ilk hedefidir. Bu tür ilaçlar TRXR'in aşırı ekspresyonuna sebep olabilmektedir. Bazı veriler yüksek TRX'in kemoterapiye direnç geliştirebileceğini ileri sürerken, bazı araştırmalar ise TRX ve TRXR'nin apoptozu indüklediğini ve p53 üzerinden hücre ölümüne götürdüğü ortaya atılmıştır (Arner and Holmgren 2006).

Tiyoredoksin ilişkili protein (TXNIP), diyabet hastalıklarında aşırı ekspresyonu ile mükemmel bir glikoz duyarlılığı sağlamaktadır. siRNA ile Txnip'in susturulması sonucu, damar oluşumuna duyarlılık, damar oluşumunda görevli proteinlerin ekspresyonunda artış ve endotel hücrelerinde bozulmalar tespit edilmiştir. Diyabetik olmayan seviyelerde Txnip nakavt farelerde, diyabetle ilgili anjiyogenez, kan akımı gibi sebeplerden dolayı oluşan problemlerde iyileşmenin yavaşladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar TXNIP'in tek fonksiyonunun TRX ile etkileşim olmadığı sonucunu ortaya atmıştır (Dunn *et al.* 2014).

Sumida *et al.* (2003) karaciğer yağlanması olan hastalarda serumda TRX seviyesinin tespiti için bir çalışma gerçekleştirmiştir. Serumda TRX seviyesinde yüksek derece artış tespit edilmiştir. Ayrıca ferritin seviyesinde de aşırı artış belirlenmiştir. Sonuç olarak karaciğer yağlanması hastalığında TRX ve ferritin ilişkisi belirlenmiştir ve bu hastalarda hepatik TRX artışı karaciğerde demir birikimine neden olduğu belirlenmiştir. Karaciğer yağlanmasının, demir birikimine neden olarak oksidatif stres oluşturduğu ve serumdaki TRX seviyesinin bu durum için bir belirteç olduğu belirlenmiştir (Sumida *et al.* 2003).

Demir metabolizmasında RNA'ya bağlanarak redoks düzenleyici protein olan IRP1'i hücre kültüründe nitrik oksit (NO) ile inkübe edilerek, Tiyoredoksin (TRX) ile muamele edilerek IRP1'in RNA'ya bağlanma oranı araştırılmıştır. TRX'in NO eşliğinde IRP1'in RNA'ya bağlanma oranında artış tespit edilmiş ve anti-TRX varlığında NO'nun RNA'ya bağlanma oranının düştüğü görülmüştür. Sonuç olarak TRX'in NO üretimi durumunda IRP1 aktivitesinin bir modülatörü olarak önemli bir rolü olduğunu belirlemişlerdir (Oliveira *et al.* 1999).

Bir grup araştırmacı diyabetik böbrekte ROS üretimini ve inflamasyonu tiyoredoksin ilişkili proteinin (TXNIP) düzenlediğini tespit etmişlerdir (Huang *et al.* 2016).

Hepatik hücrelerde inflamasyon ve lipid birikiminde ROS'ların Txnip'in ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. Txnip'in susturulmasının inflamasyon aktivatörlerini, lipid

metabolizmasındaki bozulmaları ve sıçan karaciğerinde oluşan zararı azalttığı belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2015).

2.1. Amaç

Demir homeostazisi canlılar için hayati öneme sahiptir. Organizmada demir homeostazisinde meydana gelen bir aksama, demir homeostazisinin ana düzenleyici organı olan karaciğer başta olmak üzere, beyin, kalp, böbrek gibi dokularda ağır hasara neden olmaktadır. Ayrıca demir dengesinde oluşan bozulmalar alzheimer, parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara, çeşitli kanser tiplerinin oluşmasına, kardiyovasküler hastalıklara, herediter hemakromatosis, beta-talasemi, demir eksikliği anemisi gibi hastalıklara ve doku yetmezliğine neden olmaktadır. Demir depolarının kontrolünü sağlayan ferroportin, ferritin gibi proteinlerin ve demir homeostazisinin ana düzenleyici hormonu olan hepsidinde oluşan bozulmalar vücutta demir birikimine veya eksikliğine neden olmaktadır.

Demir homeostazisindeki düzensizlikler hücrelerde süperoksit radikali oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca demir biyomolekülünün aşırı birikmesi sonucu hücrelerde Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikali ve hidrosit anyonu gibi yüksek derece reaktiviteye sahip reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan ROS'lar hücre içerisindeki DNA, RNA, proteinler, yağ asitleri gibi moleküllere saldırarak bu moleküllerin yapılarında bozulmalara ve organizmada hayati öneme sahip biyokimyasal reaksiyonlarda aksamalara neden olmaktadır.

ROS'lar hücre içerisinde normal koşullarda bulunmaktadır ve seviyeleri antioksidan sistem tarafından dengelenmektedir. Ancak çeşitli ekzojen ve endojen kaynaklar antioksidan sistemi baskılayarak ROS miktarında artmalara neden olmaktadır. ROS moleküllerinde meydana gelen artış enzimatik (Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx), Tioredoksin (TRX)) ve non-enzimatik (İndirgenmiş glutasyon (GSH), Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), vitamin C ve E gibi) antioksidanlar tarafından dengelenmektedir.

Tiyoredoksin sistem, tiyoredoksin (TRX), tiyoredoksin redüktaz (TRXR) ve NADPH içeren, oksidatif stres durumunda ilgili enzimlere elektron transportunda, redoks dengesinde, apoptozun düzenlenmesinde, DNA sentezinde ve antioksidan sistemde önemli rol oynayan bir disülfid-redüktaz sistemidir. Tiyoredoksin sistem üyesi olan Tiyoredoksin (TRX) moleküllerin oksidatif stres durumunda katalitik aktif bölgeleri ile etkileşime geçerek, disülfid/dithiol değişimlerini katalizlemektedir. Tiyoredoksin sistemin diğer bir üyesi olan Tiyoredoksin redüktaz (TRXR) TRX ile gerçekleştirdiği bir dizi redoks reaksiyonundan sonra TRX molekülünün aktifleşmesini sağlayan selenyum içeren bir selenoenzimdir. Tiyoredoksin ilişkili protein (TXNIP) ise TRX ile etkileşime girerek TRX'i tutuklayarak inaktive eden bir proteindir.

Yapılan literatür taramasında, aşırı demirin oluşturduğu oksidatif stresin elimine edilmesinde tiyoredoksin sistemin rolünün çalışılmadığı belirlenmiştir. Bu tez çalışması ile literatürdeki bu boşluğun doldurulması amaçlanmıştır. Bu amaçla demir homeostazisinin ana düzenleyici organı olan karaciğer ve böbrek dokusunda demir birikiminin oluşturduğu hasarın giderilmesinde tiyoredoksin sistemin fonksiyonu araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1. Tez dahilinde kullanılan kimyasal ve kitler

KİMYASAL ADI	ŞİRKET
Agaroz DNase-RNase-Protease free	Sigma Aldrich
Amonyum Sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma Aldrich
Akril Amid	SigmaAldrich
Amonyum Persülfat (APS)	Sigma Aldrich
Antikor (β-Aktin)	Santa Cruz Biotech
Antikor (Tiyoredoksin Redüktaz)	Santa Cruz Biotech
Antikor (Tiyoredoksin İlişkili Protein)	Santa Cruz Biotech
Bisakril Amid	Sigma Aldrich
Bromfenol Mavisi	Sigma Aldrich
Coomassie G-250 Brilliant Blue	Sigma Aldrich
Demir Ölçüm Kiti (MAK025)	Sigma Aldrich
Diklorodifeniltrikloroetan (DDT)	Sigma Aldrich
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit)	Sigma Aldrich
Etanol	Riedel-de Haen
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma Aldrich
Gliserol	Carlo Erba
Glisin	Sigma Aldrich
Glutasyon Redüktaz (GR)	Sigma Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma Aldrich
İzopropil Alkol	Sigma Aldrich
İndirgenmiş L- Glutasyon (GSH)	Sigma Aldrich
β-Merkaptoetanol	Sigma Aldrich
Metanol	Sigma Aldrich
3-N-Morfolino Propansülfonik Asit (MOPS)	Sigma Aldrich

Çizelge 3.1. (devam)

β -Nikotinamit Adenin Dinükleotid Fosfat Hidrat (NADP ⁺)	Sigma Aldrich
β -Nikotinamit Adenin Dinükleotid 2'-Fosfat Redükte Tetrasoydum Tuz Hidrat (NADPH)	Sigma Aldrich
Okside L-Glutatyon (GSSG)	Sigma Aldrich
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma Aldrich
Primer ve Prob	Metabion
Protein Markır	Thermo Fischer
Proteaz İnhibitörü	Sigma Aldrich
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)	Macherey Nagel
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen
RNA Yükleme Tamponu	Invitrogen
RNAaz Zap	Sigma Aldrich
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen
Sodyum Deoksikolat	Sigma Aldrich
Yağsız Süt Tozu (Skim Milk Powder)	Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
cDNA Sentez Kiti (SuperScript III First-Strand cDNA kit)	Invitrogen
Kemilüminesans Substrat (SubstratSuperSignal™ West Piko Substrate (ECL Reagent))	Thermo Fisher Scientific
Kemilüminesans Substrat (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ECL Reagent))	Thermo Fisher Scientific
Tert-bütıl Hidroperoksit (tbst-Hprx)	Sigma Aldrich
Trikloroasetik Asit	Riedel-de Haen
Trizma Base	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Tween-20	Riedel-de Haen

Çizelge 3.1. (devam)

N,N,N',N'-Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
2-Vinilpiridin	Sigma Aldrich
Whatman Blotlama Kâğıdı	Bio-Rad

3.2. Kullanılan Materyal ve Cihazlar**Çizelge 3.2.** Tez dahilinde kullanılan materyal ve cihazlar

MATERYAL ve CİHAZ	MARKA
BioRad Görüntüleme Cihazı	Bio-Rad
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Çeker Ocak	Space Series Fume Cupboard
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280, Siemens
Derin Dondurucu (-86°C)	New Brunswick Premium U410
Distile Su (dH2O) Üretme Cihazı	mp MINI Pure
Elektroforez (Dikey) Cihazı	Bio-Rad
Elektroforez (Yatay) Cihazı	Bio-Rad
Fusion FX Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
Güç Kaynağı	Thermo EC 135-90
Hassas Terazî	Denver Instrument
Homojenizatör	Benchmark Scientific BeadBlaster
Isıtıcı Bloğu	Lab Line
Kesim Aletleri	Fine Science Tools
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Magnetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
Mikrodalga Fırın	Beko MD 1500
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Mini Santrifüj	AOSHENG 40

Çizelge 3.2. (devam)

Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO
Otoklav	HMC HIRAYAMA
PCR	Bio-Rad C1000 Thermal Cycler
pH Metre	Mettler Toledo
Real-Time PCR	Qiagen
Soğutmalı Santrifüjler	Hettich Mikro 220R
UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10
1.5-3.0 mm Zirconium Beads	BeadBug™
15-50 mL Falcon Tüp ve Raklar	Isolab
1, 1,5 ve 3 mL’lik kuvartz küvetler	Merck
1,5-2 mL’lik Tüpler ve Raklar	Isolab
0,1 mL-0,2 mL’lik PCR Tüpü	Qiagen
Pipet Ucu	Eppendorf

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Çizelge 3.3. Tez dahilinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİK
%30’luk Akrilamid-Bisakrilamid	37,5 g Akrilamid, 1 g Bisakrilamid alınarak 128 mL dH ₂ O içerisinde 37°C’de çözündürüldü ve karanlıkta saklandı.
%10’luk Amonyum persülfat (APS)	2 mL için; 1,8 mL distile su (dH ₂ O) içerisinde 0,2 g APS çözündürüldü.
%10’luk SDS	9 mL saf suda 1 g SDS çözündürüldü.
1,5 M Tris/HCl Tamponu	181,7 g Tris 900 mL dH ₂ O içinde çözüldü, 1 M HCl ile pH:8,8’e ayarlanıp hacim distile su ile 1 L’ye tamamlandı.

Çizelge 3.3. (devam)

%5'lik Bloklama Çözeltisi	95 mL TBST içerisinde 5 g Yağsız Süt Tozu (Skim Milk Powder) veya Sığır Serum Albümin (BSA) çözdürüldü.
10X Transfer Çözeltisi	20 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 mL dH ₂ O içerisinde çözdürüldü ve pH:8,3'e ayarlanarak son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
10X TBS Çözeltisi	20 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 mL dH ₂ O içerisinde çözdürüldü ve pH:8,3'e ayarlanarak son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	30,2 g Tris, 188 g Glisin, 100 mL %10 SDS 1 L dH ₂ O içerisinde çözdürüldü.
5X SDS Yükleme Tamponu (Laemmlı Buffer)	2,5 mL Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DTT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 mL %50 gliserol, 1 g SDS alındı ve toplam hacim dH ₂ O ile 10 mL'ye tamamlandı. Alikuatlara ayrılarak -20°C'de saklandı.
Jelde Yürütülecek RNA Çözeltisi	1 µL izole edilen RNA, 3,5 µL ddH ₂ O, 0,5 µL MOPS solüsyonu, 5 µL formamid karıştırıldı. Karışım 65°C'de 15 dk inkübe edilerek hazırlandı.
0,15 mol/L İzotonik NaCl Çözeltisi	100 mL dH ₂ O içinde 0,87 g NaCl çözülerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
Bradford (Commassie Blue) Çözeltisi	100 mg Commasie-Brillant Blue G-250, 50 mL metanolde çözülüp üzerine %85'lik 118 mL fosforik asit çözeltisi eklenerek toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Alüminyum folyo ile kaplanarak oda sıcaklığında saklandı.
20X MOPS Çözeltisi	41,9 g MOPS 4,1 g sodyum asetat ve 2,6 g EDTA 350 mL DEPC'li suda çözüldü. Daha sonra NaOH ile pH:7'ye ayarlandı ve son hacim DEPC'li suyla 500 mL'ye tamamlandı ardından otoklavlanıp +4°C'de saklandı.

Çizelge 3.3. (devam)

1X MOPS Çözeltisi	Önceden hazırlanmış olan 20X MOPS solüsyonundan 25 mL alındı ve üzerine 475 mL dH ₂ O eklendi.
1X Transfer Çözeltisi	10X Transfer çözeltisinden 100 mL, 700 mL dH ₂ O, 200 mL metanol karıştırıldı.
1X TBST Çözeltisi	10X TBS çözeltisinden 100 mL alınarak 900 mL dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı ve 1 mL Tween-20 ilave edildi.
Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisinden 100 mL alınarak 900 mL dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.
RIPA Buffer	150 mM sodyum klorür, %1 Triton X-100, %0,5 sodyum deoksikolat, %0,1 sodyum dodesil sülfat (SDS), 50 mM Tris alındı, bir miktar dH ₂ O içerisinde çözüldükten sonra pH:8,0'e ayarlandı ve son hacmi 25 mL'ye tamamlandı.
50 mM Potasyum Fosfat Çözeltisi	1,02 gr KH ₂ PO ₄ , 135 mL dH ₂ O içinde çözdürüldü ve pH:7,4'e ayarlandı. Son hacim 150 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.
Stripleme Çözeltisi	15 gr Glisin, 1 gr SDS, 10 mL Tween-20 bir miktar dH ₂ O içinde çözdürüldü ve pH:2,2'ye ayarlandı. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.
3,4 mM EDTA'lı 0,1 M Potasyum Fosfat Çözeltisi	0,68 gr K-fosfat (monobazik) 40 mL saf suda çözdürüldü. pH:7,5'a ayarlandı. 0,099 gr EDTA eklendi ve tekrar pH'a bakıldı, son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
20 mM GSSG Çözeltisi	0,122 gr GSSG alındı ve 10 mL saf suda çözdürüldü.
2 mM NADPH Çözeltisi	0,0083 gr NADPH alındı ve 5 mL saf suda çözdürüldü.
20 mM GSH Çözeltisi	0,061 gr GSH alındı ve 10 mL saf suda çözdürüldü.

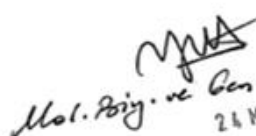
Çizelge 3.3. (devam)

100 mM Potasyum Fosfat Çözeltisi	100 mM K-fosfat (monobazik) alındı ve 90 mL saf suda çözdürüldü. pH:6,5'e ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
0,5 EU/ mL GR Çözeltisi	2 µL 500 Unit'lik GR çözeltisinden alındı ve 2 mL'ye dH ₂ O ile tamamlandı.
7 mM Tert-butil Hidroperoksit Çözeltisi	9,61 µL tert-butil hidroperoksit alındı ve 10 mL'ye tamamlandı.
0,5 EU GR Çözeltisi	2 µL 500 Unit'lik Glutasyon redüktaz çözeltisinden alındı ve son hacim 2 mL'ye tamamlandı
%5'lik TCA Çözeltisi	5 gr TCA alınıp son hacim 100 mL olacak şekilde dH ₂ O'da çözdürüldü.
6 mM DTNB Çözeltisi	0,0071 gr DTNB alındı ve 3 mL EDTA'lı tamponda çözüldü.
50 mM Tris-HCl Çözeltisi	0,3 gr Tris alınıp, 40 mL dH ₂ O çözüldü ve pH:8,0'a ayarlandı. Ardından son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.4. Farelerde Sistemik Demir Yükleme Modelinin Oluşturulması

Araştırma “Tip60 Geninin Demir Homeostasisi ve İnflamasyon Üzerine Etkisinin Fare Karaciğerinde Araştırılması” konulu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 114Z277 nolu 1001 Programı Araştırma Projesinde kullanılan fare karaciğer ve böbrek dokuları ile gerçekleştirildi. Kontrol ve demir yüklemesi yapılan muamele grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu. Her bir grupta 5'er adet 8-10 haftalık BALB/c ırkı erkek fare bulunduruldu. Deney süresince fareler standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve oda sıcaklığında (20-25°C) muhafaza edildi. Standart fare yemi ve yeterli miktarda ultrapür su (ddH₂O) ile beslendi. Farelerin ortama adaptasyonu için 3 gün beklendikten sonra muamele grubunda sistemik demir yüklemesi oluşturmak için 5 mg dekstran5 solüsyonu (100 mg/mL stok solüsyondan 50 µL, Sigma Aldrich-d8517), 3 hafta boyunca haftada iki defa (toplamda 6 doz) intraperitoneal olarak verildi. Buna paralel olarak kontrol grubu farelere ise 0,5 mg

dekstran5 solüsyonundan 100 µL (5 mg/mL stok solüsyondan 100 µL, Chemos GmbH, Regensburg) intraperitoneal olarak verildi. Son enjeksiyondan sonraki enjeksiyon gününde farelerin boynu kırılarak sakrifiye edildi ve karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak araştırmaya yönelik olarak karaciğer ve böbrek dokuları toplandı. Elde edilen dokular -86°C'de muhafaza edildi.

 T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı	<table border="1" style="font-size: small;"> <tr><td>T.C.</td><td>ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ</td></tr> <tr><td>Fen Fakültesi Dekanlığı</td><td></td></tr> <tr><td>Tarih</td><td>27.03.2014</td></tr> <tr><td>Kayıt No</td><td>586</td></tr> <tr><td>Dosya No</td><td>21</td></tr> </table>	T.C.	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ	Fen Fakültesi Dekanlığı		Tarih	27.03.2014	Kayıt No	586	Dosya No	21
T.C.	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ										
Fen Fakültesi Dekanlığı											
Tarih	27.03.2014										
Kayıt No	586										
Dosya No	21										
Sayı : 36643897-63 Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.	20.03.2014 ERZURUM										
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA 25240 – Kampus / ERZURUM											
İlgi : 13.03.2014 tarih ve 55885869-381 sayılı yazınız. İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Harun BUDAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülecek olan "Tip60 Geninin Demir Homeostazisi ve İnflamasyon Üzerine Etkisinin Fare Karaciğerinde Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 19.03.2014 tarih ve 2 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 48 no'lu kararı ile söz konusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.											
 <i>Mol. Biy. ve Gen. Böl. Baplı na</i> 24 Mart 2014  Doç. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ Başkan Vekili											
Toplantı Tarihi : 19.03.2014 Toplantı Sayısı : 2 KARAR NO : 48- Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Harun BUDAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülecek olan "Tip60 Geninin Demir Homeostazisi ve İnflamasyon Üzerine Etkisinin Fare Karaciğerinde Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Fen Fakültesi Dekanlığının 13.03.2014 tarih ve 55885869-381 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü. Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.											
Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM Telefon : 0-442-231 47 30 Fax : 0-442-231 55 63 e-mail: hadyck@atauni.edu.tr											
26 Mart 2014											

Şekil 3.1. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanmış etik kurul belgesi

3.5. Real Time PCR Uygulaması

3.5.1. Total RNA izolasyonu

Araştırmaya yönelik olarak, kontrol ve demir yüklemesi yapılmış muamele grubu fare karaciğer ve böbrek dokularından cDNA kütüphanesi oluşturmak amacıyla total RNA izolasyonu PureLink™ RNA Mini Kitindeki (Ambion by Life Technologies) protokole göre gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu için homojenat hazırlanışı aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- Wash buffer II üzerine 60 mL %100 etanol eklendi.
- 1 mL QIAzol Lysis Reagent 10 µL β-merkaptoetanol eklenerek liziz buffer oluşturuldu.
- En fazla 40 mg fare karaciğer ve böbrek dokusu alınarak 2 mL'lik kapaklı eppendorf tüplerine konuldu.
- Üzerine 1,2 mL liziz buffer eklenen dokular homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 4260 rpm'de 30 sn parçalandı.
- Homojenizasyondan sonra 2600 g'de 5 dk 25°C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

PureLink™ RNA Mini Kiti ile RNA izolasyon protokolü aşağıdaki protokol uygulandı:

1. 1:1 hacminde homojenatlara %70'lik alkol eklenip vortekslendi.
2. Spin Cartridge tüpe ≤ 700 µL örnek transfer edildi.
3. 1200 g'de 15 sn 25°C'de santrifüj edildi ve alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
4. 2 ve 3. adımlar tekrarlandı.
5. 700 µL Wash Buffer I, Spin Cartridge tüpe eklendi. 12000 g'de 15 sn 25°C'de santrifüj edildi.
6. Kolon yeni bir Collection tüpe aktarıldı.

7. 500 µL Wash Buffer II kolona eklendi. 12000 g'de 15 sn 25°C'de santrifüj edildi.
8. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
9. 7 ve 8. adımlar tekrar edildi.
10. 12000 g'de 1 dk 25°C'de santrifüj edildi.
11. Kolon yeni bir Recovery tüpe aktarıldı.
12. 30-100 µL RNase Free Water kolona eklendi.
13. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
14. 2 dk 12000 g'de 25°C'de santrifüj edildi.
15. Kolonlar atıldı ve elde edilen tüplerdeki RNA'lar -86°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezinde incelenmesi

Jel elektroforezi, makromolekülleri elektriksel yükleri, molekül ağırlıkları ve diğer fiziksel özelliklerine göre ayıran bir analiz yöntemidir. Agaroz ve poliakrilamid jellerin kullanıldığı bu yöntem yüklü partiküllerin elektrik akımı altında jel ortamında hareket etmesi esasına dayanır. Elektrik alanının, molekülü jel ortamında hangi hızla hareket ettirdiği molekülün özelliğine göre değişmektedir. Biyolojik makromoleküller (amino asitler, proteinler, peptitler, nükleotid ve nükleik asitler gibi) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH bağımlı olarak çözelti içerisinde katyon (+) veya anyon (-) elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar (Westermeier 1997).

Total RNA jelde 28S (veya 23S) ve 18S (veya 16S) rRNA bantları olarak görülür. 18S rRNA bandı 28S rRNA bandının yaklaşık yarısı kadar parlaklık oluşturur. Bu 2:1 oranı toplam RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin bir göstergesidir (Kocpınar 2015).

3.5.3. Agaroz jelin hazırlanışı

5,64 mL 20X MOPS çözeltisine sırasıyla, 0,9 g agaroz ve 85,5 mL ddH₂O eklendikten sonra mikrodalgada kaynatıldı. Hazırlanan çözelti 37°C'ye soğuduktan sonra 20,04 µL formamid ve 16,5 µL Etidyum bromür (EtBr) eklenerek jel polimerleşmeye bırakıldı.

3.5.4. Yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı

İzole edilen RNA örneklerinden 1 μ L alınarak 3,5 μ L ddH₂O ile karıştırıldı. Bu işlemten sonra 0,5 μ L 20X MOPS ve 5 μ L formamid eklenerek 65°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından RNA örnekleri 1 μ L 6X yükleme tamponu ilave edilerek agaroz jele yüklendi.

3.5.5. Elektroforez işlemi

Hazırlanan agaroz jele 7-10'ar μ L kadar RNA örnekleri yüklendi. Yüklenen örnekler 80 V (Volt) 30 dk yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra görüntüleme cihazıyla (Quantum Vilber Lourmat) jelin görüntüsü alındı.

3.5.6. Total RNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi

DNA ve RNA izolasyonu sonrası miktar tayininde absorpsiyon esasına dayanarak çalışan spektrofotometrik ölçüm yapan cihazlar kullanılır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen nükleik asitlerin saflığını belirlemek ve miktar tayini yapabilmek için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılması gereklidir. Herhangi bir kirlilik içermeyen saf DNA örneklerinde A_{260}/A_{280} oranı yaklaşık olarak 1.8 değerinde ölçüm verir. Proteinlerin ve izolasyonda kullanılan fenolün oluşturduğu kirlilik durumunda 1.8'in altında, istenmeyen RNA ların varlığında ise 1.8 in üstünde bir değer elde edilir. Saf RNA örneklerinde A_{260}/A_{280} oranı ise yaklaşık olarak 2 değerinde ölçüm verir. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü nanodrop (Thermo Scientific Multiscan GO USA) ile belirlendi (Bastem 2017).

3.5.7. cDNA kütüphanesinin hazırlanması

İzole edilen mRNA'lardan cDNA sentezi için ProtoScript First Strand cDNA Sentez kiti (New England BioLabs) kullanıldı.

cDNA kütüphanesinin oluşturulması Çizelge 3.4’de gösterildiği gibi uygulandı;

Çizelge 3.4. cDNA sentez kiti protokolü

Komponent Bileşenler	Hacim (µL)
Total RNA	1-6
Nükleaz Free Water	Değişken miktar
d(T) ₂₃ VN (50 µM)	2
Total Hacim	8

- Komponent bileşenler steril mikrosantrifüj tüpüne konuldu. RNA içeren bu örnekler 70°C’de 5 dakika süreyle denatüre edildi. Kısaca spin edildi ve buz üzerine konuldu (Bu basamak opsiyoneldir).
- Tüplere (her bir tüp için) aşağıdaki bileşenler eklendi:

M-MuLV Reaction Mix	10 µl
M-MuLV Enzyme Mix	2 µl

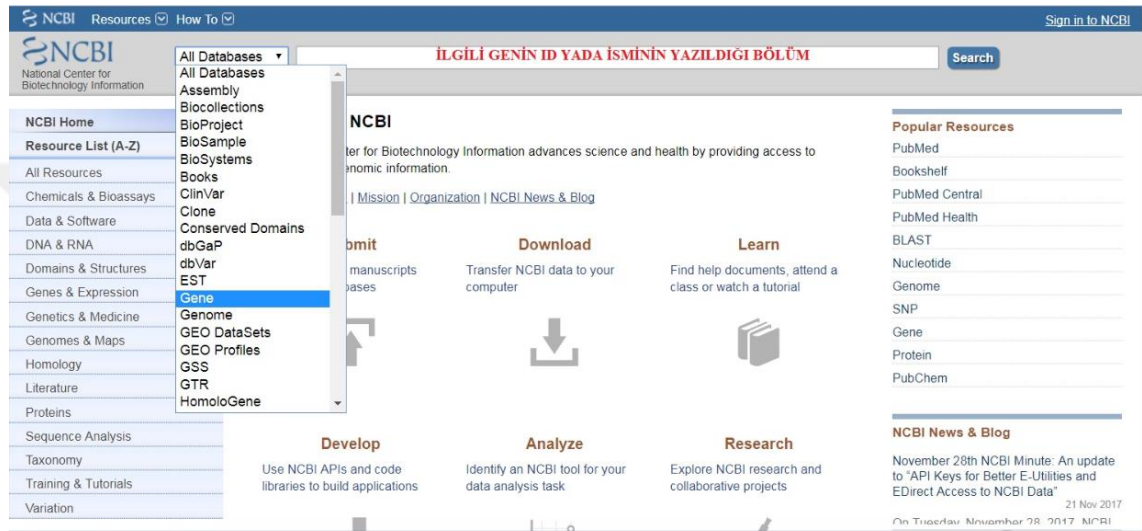
- Random primer kullanıldığı için 20 µl olan cDNA sentez reaksiyonu 42°C’de 1 saat basamağından önce 25°C’de 5 dakika inkübasyon basamağı eklendi.
- Enzim 80°C’de 5 dakika basamağıyla inaktive edildi. cDNA sentez işlemi BIORAD C1000TM Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.
- Elde edilen cDNA’lar Real-Time PCR’da kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.5.8. Primer ve prob dizaynı

3.5.8.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması

Tez dahilinde çalışılacak Tioredoksin sistem genleri olan Tioredoksin (Trx), Tioredoksin Redüktaz (TrxR) ve organizmadaki demir homeostazisinde büyük öneme sahip olan Hepsidin (Hamp), Ferritin (Fth) ve Ferroportin (Fpn) genlerine spesifik

olarak tasarlanacak olan primer ve prob dizaynı için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanıldı. NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'na girilerek Şekil 3.2'deki gibi “All databases” bölümünden “Gene” sekmesi seçildi ve arama motoruna gen bilgisi (kısa veya uzun adı ya da ID numarası) girilerek “Search” tıklandı.



Şekil 3.2. Primer ve prob dizayn etmek için kullanılan NCBI sayfası

Tez dahilinde çalışılacak model organizma olarak fare kullanıldığı için ilgili bölüme “*Mus musculus* (house Mouse)” yazılarak Şekil 3.3'teki gibi bu organizmaya ait gen bilgilerine ulaşıldı.

The screenshot shows the NCBI Gene database search results for 'Thioredoxin 1 [Mus musculus (house mouse)]'. The search bar at the top contains the query. Below the search bar, there are links to 'Create RSS', 'Create alert', and 'Advanced'. The results are displayed in a table with columns: Name/Gene ID, Description, Location, Aliases, and MIM. The first result is 'Txn1' (ID: 22166) for 'thioredoxin 1 [Mus musculus (house mouse)]'. A red arrow points to the 'Txn1' checkbox. The second result is 'Txn1' (ID: 116484) for 'thioredoxin 1 [Rattus norvegicus (Norway rat)]'. On the right side, there are filters for 'Results by taxon' and 'Top Organisms'.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
☒ Txn1 ID: 22166	thioredoxin 1 [Mus musculus (house mouse)]	Chromosome 4, NC_000070.6 (57943373..57956411, complement)	ADF, AW550880, Trx1, Txn	
☐ Txn1 ID: 116484	thioredoxin 1 [Rattus norvegicus (Norway rat)]	Chromosome 5, NC_005104.4 (75049735..75057731, complement)	Txn	

Şekil 3.3. Primer ve prob dizayn etmek için kullanılan organizmanın seçildiği ve ilgili genin özelliklerini gösteren NCBI sayfası

İstenilen genin aratılması sonucu Şekil 3.3’de görüldüğü gibi seçildi ve Şekil 3.4’de istenilen genin gen ve protein sekanslarına ulaşıldı.

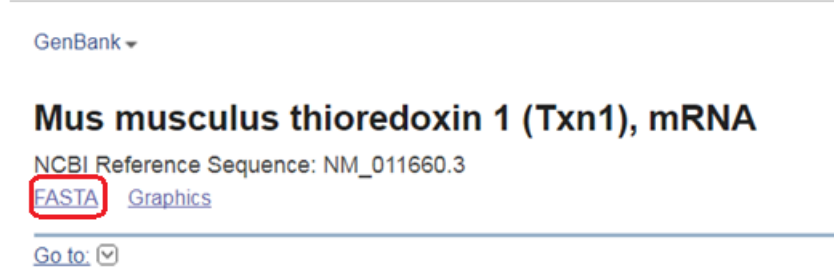
The screenshot shows the NCBI Reference Sequences (RefSeq) page for 'thioredoxin'. The page title is 'NCBI Reference Sequences (RefSeq)'. Below the title, there is a link to 'RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes'. The main content area is titled 'mRNA and Protein(s)' and shows the 'NM_011660.3' and 'NP_035790.1' sequences. A red arrow points to the 'NM_011660.3' sequence. Below the sequences, there is a section for 'Status: VALIDATED' and a table with columns: Source sequence(s), Consensus CDS, UniProtKB/Swiss-Prot, Related, and Conserved Domains (1) summary. The table contains the following information:

Source sequence(s)	Consensus CDS	UniProtKB/Swiss-Prot	Related	Conserved Domains (1) summary
AK007537, AL929406	CCDS18207.1	P10639	ENSMUSP00000030051.5, OTTMUSP00000007887, ENSMUST00000030051.5, OTTMUST00000017076	pfam00085 Location: 7 → 104 Thioredoxin; Thioredoxin

Şekil 3.4. İlgili genin, gen ve protein sekansını gösteren NCBI sayfası

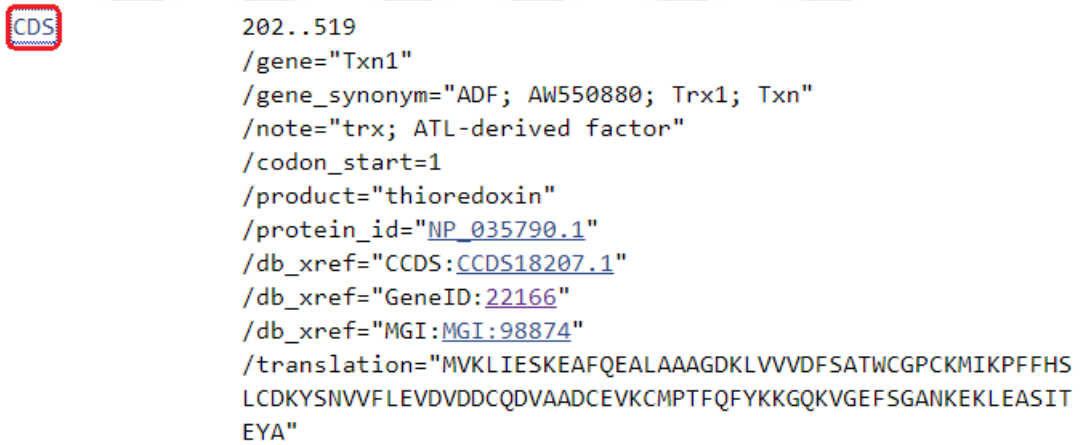
Veri tabanında mRNA ve protein kısmında gen sekans kodu “NM_....”, protein sekans kodu ise “NP_....” olarak gösterilmiştir. Şekil 3.5’de görüldüğü gibi “NM_....” olan gen

sekans kodu tıklanarak istenilen genin sekans ve diğer bilgilerinin bulunduğu bir sonraki sayfaya ulaşıldı.



Şekil 3.5. İlgili genin sekansının bulunduğu veritabanı

İlgilenilen genin detaylı olarak sekansına ulaşılabilmek için Şekil 3.6'daki FASTA sekmesi tıklandı ve ekzon ve intron bölgelerini içeren mRNA sekansına ulaşıldı.



Şekil 3.6. İlgili genin protein kodlayan bölgesinin gösterildiği internet sayfası

Şekil 3.6'deki görülen sayfanın alt kısımda ilgilenilen gene ait bazı özelliklerin bulunduğu ve bir genin protein kodlayan bölgesi olarak ifade edilen "CDS" sekmesinin bulunduğu Şekil 3.6'deki sayfa mevcuttur. Bu "CDS" sekmesi seçildi ve Şekil 3.7'deki sayfaya ulaşıldı. Bu "CDS" bölümü ilgili gene spesifik primer ve prob dizayn edilirken genin hangi bölümünün kullanılması gerektiğini gösterdiği için yarar sağlamaktadır.

ORIGIN

```

1 ccaggcgccct tggcggacgc gggaggcggg aagcgcgtcc ccgccgcgcg tgcccgtccg
61 ccccgccctg ctgcgctccg ccctatttct ataaagagaa ggccggcgcc gcactcggtt
121 gcaagctccg ttggcgccct tggatccatt tccatctggt tctgctgaga cgcgtgtggc
181 tccctccccg caacagccaa atgggtgaag ctgatcgaga gcaaggaaac ttttcaggag
241 gccctggcgc cgcggggaga caagcttgc gtgggtggact tctctgctac gtgggtgga
301 ccttgcaaaa tgatcaagcc cttcttccat tccctctgtg acaagtattc caatgtggtg
361 ttcttgaag tggatgtgga tgactgccag gatgttgctg cagactgtga agtcaaatgc
421 atgccgacct tccagtttta taaaaagggt caaaagggtg gggagtctc cgggtgtaac
481 aaggaaaagc ttgaagctc tattactgaa tatgcctaat catgctctga aaagtgtaac
541 cagctaccag ctgtttaaaa cctgtacctt ttttaatttg caaaaaacta tgaagtgtgg
601 agagtctata cccaactgcc atctgattat aaatgacaat aaaatattaa ttctaccctt
661 tttaaaaactg cctgatgtgt tttatataa atgagaaatg gcctgattta gtcccctaag
721 ccaactgcttt aaggcaaaaa gataggagct ggagagggtg ctcagctggt tagaacattg
781 cctgttcttg cagagggccca aagttcagtt ctcagcatcc atacggcagc tacctgttcc
841 tccagttcca gggaatctga tgtctctac tggccaccat gggcaccaa gcatgtctgaa
901 gtacatgtac attacatgta actaacatac acataaactt tttaaaatct ttttttaaaa
961 cttaatattt agttgtagaa aatctcggtt attcgggtac attaaaagtc ttgggggggg
1021 ggtattttac cttataaat aaacatggtc c

```

Şekil 3.7. Trx1 genine ait kodlanan ve kodlanmayan dizinin bulunduğu veritabanı

Şekil 3.7’de gösterilen sekans dizisinde yer alan satır boşlukları ve sıra sayıları primer ve prob dizayn işleminde sonraki adımda çeşitli sorunlar oluşturabileceği için bu sayfanın sağ alt köşesinde bulunan “FASTA” sekmesi seçilerek Şekil 3.8’deki sıra sayısı ve satır aralarında boşluk bulunmayan gen sekansına ulaşıldı. Ardından <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> programı kullanılarak, genlere ait ekspresyon seviyelerini belirlemek için primer ve prob dizaynı yapıldı.

FASTA ▾

Mus musculus thioredoxin 1 (Txn1), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_011660.3

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NM_011660.3:202-519 Mus musculus thioredoxin 1 (Txn1), mRNA

```

ATGGTGAAGCTGATCGAGACGAAGGAAGCTTTTCAGGAGGCCCTGGCCGCCGCGGGAGACAAGCTTGTCG
TGGTGGACTTCTCTGCTACGTGGTGTGGACCTGCAAAATGATCAAGCCCTTCTTCCATTCCCTCTGTGA
CAAGTATTCCAATGTGGTGTTCCTTGAAGTGGATGTGGATGACTGCCAGGATGTTGCTGCAGACTGTGAA
GTCAAATGCATGCCGACCTTCCAGTTTATAAAAAGGGTCAAAAGGTGGGGGAGTTCTCCGGTGCTAACA
AGGAAAAGCTTGAAGCCTCTATTACTGAATATGCCTAA

```



Şekil 3.8. Trx1 genine ait FASTA dizisi

Primer ve prob tasarlarırken dikkat edilmesi gereken bazı noktalar;

- Proben bağlanma sıcaklığı genellikle primerin bağlanma sıcaklığından $\sim 10^{\circ}\text{C}$ yüksek olmalı,
- Proben soğurucunun tutturulacağı 5'ucu G ile bitmemeli,
- Proben GC içeriği genellikle %35-65 arasında olmalı,
- Genellikle G ve C ile başlayan dizilimler tercih edilmemeli,
- Primer ve problemlerin kendi aralarında ve kendi kendilerine bağlanma ihtimalleri olabildiğince düşük olmalı,
- Amplifikasyon bölgesinin boyutu 60-150 bp arasında seçilmeli.

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

[Checks for mispriming in template.](#)
[Primer3plus interface](#)

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgt -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALU; [repeat library](#)): NONE

```
ATGGTGAAGCTGATCGAGAGCAAGGAAGCTTTT CAGGAGGCCCTG6CCGCCG6G6A5ACAAGCTTGTGCG
TGSTGGACTTCTCTGCTACGTGGTGTGGACCTTGCAAAATGATCAAGCCCTTCTTCCATTCCCTCTGTGA
CAAGTATCCAATGTGGTGTTCCTTGAAAGTGGATGTGGATGACTGCCAGGATGTTGCTGCAAGCTGTGAA
GTCAAATGCATGCCGACCTTCCAGTTTTATAAAAAGGTCAAAAGGTGGGGAGTTCTCGGTGCTAACA
AGGAAAAGCTTGAAGCCTCTATTACTGAATATGCCTAA
```

☒ Pick left primer, or use left primer below: ☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below: ☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

Şekil 3.9. Primer ve prob tasarlamak için kullanılan veritabanı

Şekil 3.9’de gösterildiği gibi primer ve prob dizayn edilecek mRNA dizisi boş kutucuğa kopyalandı, left primer, right primer ve TaqMan yöntemi kullanılacağı için prob kutucukları işaretlendi.

Product Size Ranges

Number To Return Max 3' Stability

Max Repeat Mispriming Pair Max Repeat Mispriming

Max Template Mispriming Pair Max Template Mispriming

Pick Primers Reset Form

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: Opt: Max:

Primer Tm Min: Opt: Max: Max Tm Difference: [Table of thermodynamic parameters:](#) Breslauer et al. 1986 ▼

Product Tm Min: Opt: Max:

Primer GC% Min: Opt: Max:

Max Self Complementarity: Max 3' Self Complementarity:

Max #N's: Max Poly-X:

Inside Target Penalty: Outside Target Penalty: [Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target](#)

First Base Index: CG Clamp:

Concentration of monovalent cations: Salt correction formula: Schildkraut and Lifson 1965 ▼

Concentration of divalent cations: Concentration of dNTPs:

Şekil 3.10. Primere ait bilgilerin girildiği sayfa

Şekil 3.10'de görülen sayfada bulunan “General Primer Picking Conditions” kısmında primer ve prob dizaynı için gerekli olan boyut, bağlanma sıcaklığı (T_m), %GC oranı, amplifikasyon bölgesi uzunluğu değerleri arzu edilen şekilde girildi ve ‘Pick Primers’ sekmesi tıklanarak Şekil deki primer ve prob dizilimleri elde edildi.

Hyb Oligo (Internal Oligo) General Conditions

Hyb Oligo Size: Min: Opt: Max:

Hyb Oligo Tm: Min: Opt: Max:

Hyb Oligo GC% Min: Opt: Max:

Hyb Oligo Self Complementarity: Hyb Oligo Max 3' Self Complementarity:

Max #Ns: Hyb Oligo Max Poly-X:

Hyb Oligo Mishyb Library: Hyb Oligo Max Mishyb:

Hyb Oligo Min Sequence Quality:

Hyb Oligo Conc of monovalent cations: Hyb Oligo DNA Concentration:

Hyb Oligo conc of divalent cations: Hyb Oligo [dNTP]:

Şekil 3.11. Proba ait bilgilerin girildiği sayfa

Primer3 Output

```

No mispriming library specified
No hyb oligo mishyb library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Hybridization probe is unacceptable: Tm too high

OLIGO          start  len   tm   gc%  any  3' seq
LEFT PRIMER    863    18   60.09 61.11 2.00 0.00 TGCTGGCGGTAGGAAGAG
RIGHT PRIMER   1081   20   59.97 55.00 4.00 3.00 AGCCTCCATACAGCCTCTGA
HYB OLIGO      900    22   70.69 63.64 3.00 0.00 TGGCTTAGAGACCGTGGGCGTG
SEQUENCE SIZE: 1500
INCLUDED REGION SIZE: 1500

PRODUCT SIZE: 219, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

1 ATGAATGGCTCCAAAGATCCCCCTGGGTCCTATGACTTCGACCTGATCATCATTGGAGGA

61 GGCTCAGGAGGACTGGCAGCAGCTAAGGAGGCAGCCAAATTTGACAAGAAAGTGTGGTC

121 TTGGATTTTGTACACCGACTCCTCTTGGGACCAGATGGGGTCTCGGAGGAACGTGTGTG

181 AATGTGGGTTGCATACCTAAGAAGCTGATGCACCAGGCAGCTTTGCTCGGACAAGCTCTG

241 AAAGACTCGCGCAACTATGGCTGGAAAGTCGAAGACACAGTGAAGCATGACTGGGAGAAA

```

Şekil 3.12. Tasarlanan primer ve probuna ait özellikleri gösteren sayfa

Dizayn edilen primer ve probun başka genlerle homolojisinin olup olmadığı <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> veritabanı kullanılarak Şekil 3.13'deki görüldüğü gibi kontrol edildi ve Şekil 3.14'deki blastlama sonuçları elde edildi.

Enter Query Sequence BLASTN programs se

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) [Query subran](#)

İlgili gene ait primer sekansının yazıldığı alan

Or, upload file [Dosya Seç](#) Dosya seçilmedi [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database

☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism

Optional **Mus musculus (taxid:10090)** ☐ Exclude [+](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Exclude

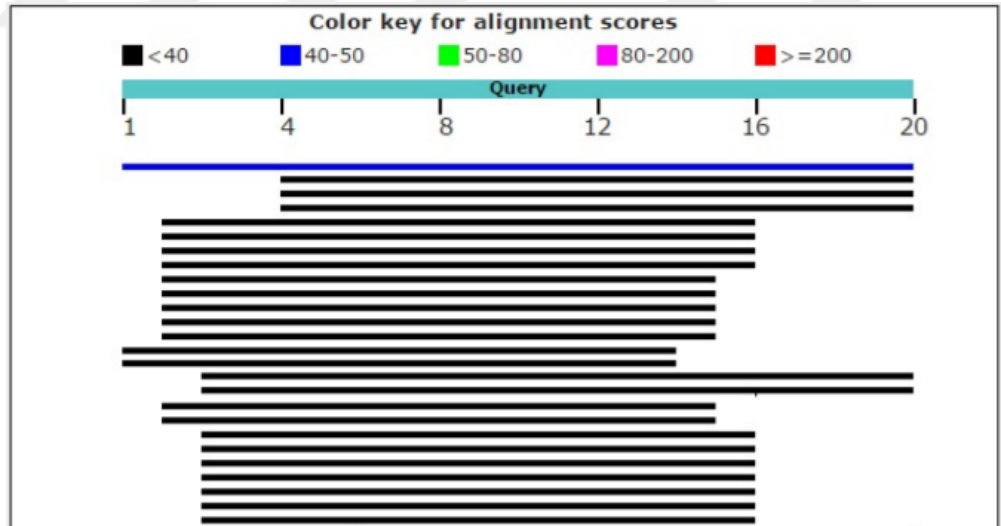
Optional ☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

BLAST

Search **database Nucleotide collection (nr/nt)** using **Megablast (Optimize for hi**

☐ Show results in a new window

Şekil 3.13. Gen sekans homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası



Şekil 3.14. Tasarlanan primer ve probun homolojisinin kontrol edilmesi için blastlandığı sayfa

Bu işlemler sonucu belirlenen araştırma doğrultusunda kullanılacak en uygun primer ve prob listesi Çizelge 3.5’de görülmektedir.

Çizelge 3.5. Gen ekspresyon profillerine bakılacak genler için dizayn edilen primer ve prob listesi

Gen Adı	Gen Erişim No	Primer- Prob	İlgili Dizi (5'-3')	T _m (°C)
Hamp	NM_032541.1	Forward	CTGCCTGTCTCCTGCTTCTC	60.3
		Reverse	TGTCTGCCCTGCTTTCTTCC	60.4
		Prob	Fam-GCCAGCCTGAGCAGCACCACC-Tamra	72.0
Fpn	NM_016917.2	Forward	TCGGACTGGTCTATTCTCAGG	58.0
		Reverse	ACACTGGCTCCACATTACACA	58.0
		Prob	Fam-TCTCCGTATTTCATGCCTGGAAGCC-Tamra	67.0
Fth	NM_010239.2	Forward	AAGTGCGCCAGAACTACCAC	60.0
		Reverse	TTCAGAGCCACATCATTCTCG	60.0
		Prob	Fam-TCTCCGTATTTCATGCCTGGAAGCC-Tamra	70.0
Trx	NM_011660.3	Forward	TCCAATGTGGTGTTCCTTGA	54.1
		Reverse	CCTTGTTAGCACCGGAGAAC	55.7
		Prob	Fam-TCAAATGCATGCCGACCTTCCA-Tamra	59.6
TrxR	NM_011660.3	Forward	TGCTGGCGGTAGGAAGAG	57.0
		Reverse	AGCCTCCATACAGCCTCTGA	57.7
		Prob	Fam-TGGCTTAGAGACCGTGGGCGTG-Tamra	64.6
B-Aktin	NM_007393.4	Forward	AATCGTGCGTGACATCAAAG	59.72
		Reverse	CGTTGCCAATAGTGATGACCT	59.32
		Prob	Cy5-ATGGCCACTGCCGCATCCTC-BQ2	69.42

3.5.8.b. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) analizi

PCR, DNA veya cDNA üzerinde belirlenen bir ya da birden fazla gen bölgesinin in vitro şartlarda çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. 1986 yılında Mullis ve arkadaşlarının icat edip, 1993 yılında kimya alanında Nobel ödülü aldıkları, moleküler düzeydeki çalışmalara yenilik getiren bu buluş daha sonra Gradientli PCR, Multiplex PCR, Nested PCR, Real Time PCR gibi PCR yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Çeşitli yayınlarda adından Florasan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif-Kinetik PCR olarak bahsedilen Real Time PCR (qRT – PCR) klasik PCR sonucu oluşan gen kopyalarının sayısal değerlere dönüştürülebildiği, PCR reaksiyonu sırasında çeşitli florasan boyalar ile Real Time yani eşzamanlı olarak reaksiyonun izlenebildiği ve istenilen sayıda

döngüde gerçekleştirilebilen bir PCR çeşididir. SYBR Green ve TaqMan olarak reaksiyonlar dizayn edilebilir. SYBR Green için hazırlanan mix de primer ile birlikte prob bulunmaz ve ekspresyon analizi yapılacak hedef gen ile referans olarak kullanılacak (housekeeping) gen iki ayrı tüpe pipetlenir ve ayrı şekilde reaksiyona sokulur. TaqMan ise primer ile birlikte prob dizayn edilmiş ise hedef gen ve housekeeping gen tek bir tüp içinde olacak şekilde bir mix hazırlanır ve tek tüp reaksiyona girer. Bu yöntem hassasiyet açısından daha güvenilirdir ve hata payı azdır. TaqMan da dizayn edilen hedef gen probunun 5' ucuna raporör florokrom 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' ucunda baskılayıcı florokrom 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) floresan etiketi takıldı.

Araştırmaya yönelik olarak demir yüklemesi yapılmış 4 muamele grubu ve 5 adet kontrol grubu farelerden olmak üzere toplam 9 adet fareden alınan karaciğer ve böbrek dokularından izole edilen total RNA dan Reverse Transkriptaz enzimi yardımıyla elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında seyreltilerek Real Time PCR reaksiyonu için kullanıldı.

Real Time PCR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı ve pipetleme prosedürü Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi uygulandı.

Çizelge 3.6. Taqman Probe (Multipleks Real Time PCR) reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal konsantrasyonu ve kullanılan miktar

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Miktar (µL)
ddH ₂ O (Steril)	-	8,5
TaqMan® Probe Master Mix	1X	12,5
Hedef gen-Forward Primer	0,8 pmol	0,25
Hedef gen- Reverse Primer	0,8 pmol	0,25

Çizelge 3.6. (devam)

Referans gen- Forward Primer (β-Aktin)	0,8 pmol	0,25
Referans gen- Reverse Primer (β-Aktin)	0,8 pmol	0,25
Hedef gen- Prob	0,4 pmol	0,15
Referans gen-Prob (β-Aktin)	0,4 pmol	0,25
cDNA	0,02 ng/ μ L	2,5
Total		25

3.5.8.c. Real Time PCR sonuçlarının istatistiki analizi

Kontrol ve muamele gruplarından elde edilen sonuçların analizinde kullanılan ΔC_T metodunun formülü aşağıdaki gibidir;

$$\text{Ekspresyon Seviyesi} = 2^{C_{T(\text{Referans})} - C_{T(\text{Hedef})}}$$

2: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı (Bu oran %100'e yakın ise 2 alınır.)

CT Referans: Reaksiyon sırasında referans (housekeeping) genin miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer

CT Hedef: Reaksiyonu sırasında hedef genin miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer

Kontrol ve demir yüklemesi muamele gruplarından elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programından yararlanılarak yapıldı ve Unpaired t test uygulandı. Bütün sonuçlarda mean $\pm$ standard hata (SEM) değerleri analiz edildi. Yıldız olarak ifade edilen değerler

istatistiksel analiz sonucu elde edilen p önem değerlerini ifade etmektedir. Önem derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir. $p>0,05=ns$ (not significant) önemsiz, $p<0,05=*$ (significant) önemli, $p<0,01=**$ (very significant) çok önemli, $p<0,001=***$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

3.6. Antioksidan Sistem Bağıntılı Bazı Metabolit Seviyelerinin Ölçümü

3.6.1. İndirgenmiş-yükseltgenmiş glutatyon (GSH-GSSG) seviyelerinin ölçümü

GSH yapısında bulunan sülfidril grubunun asitte çözünmesi ile tiyol grubunun enzimatik ve kimyasal işlemler ile ölçülmesi sonucu bu bileşiğin miktar tayini belirlenir. 412 nm’de belirlenen absorbans değerleri $\mu\text{mol/ml}$ olarak ölçülür (Ansari *et al.* 1980).

Glutatyon miktarı, Griffith (1980) tarafından uygulanan yöntemin modifikasyonu ile ölçüldü.

Kontrol ve demir yüklemesi muamele grubu fare karaciğer ve böbrek dokuları toplam ve yükseltgenmiş glutatyon (GSH-GSSG) seviyeleri ölçümü aşağıdaki sıra izlenerek yapıldı;

- 1:5 oranında %5’lik TCA çözeltisi ile homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) kullanılarak 3500 speed 5 cycle (her cycle 1 dk süreyle) olmak üzere parçalandı,
- $+4^{\circ}\text{C}$ 13000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen süpernatantların üzerine 1,25 M K_2CO_3 eklendi (örn: 300 μL süpernatant için 38,7 μL K_2CO_3 eklendi).
- Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar toplam glutatyon (GSH-GSSG) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ölçümleri için iki basamağa ayrıldı.

Birinci basamak toplam glutasyon (GSH) seviyesinin ölçüldüğü basamaktır. Homojenatlar 412 nm dalga boyunda 5 dk süre ile glutasyon miktar tayini aşağıdaki Çizelge 3.7’de gösterilen pipetleme prosedürü uygulanarak ölçüldü.

Çizelge 3.7. GSH ve GSSG ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
200 mM K-fosfat tampon (50 mM EDTA’lı)	230	200
2 mM NADPH	30	30
Süpernatant	-	30
0,5 EU/ mL GR	10	10
6 mM DTNB	30	30
Toplam Hacim	300	300

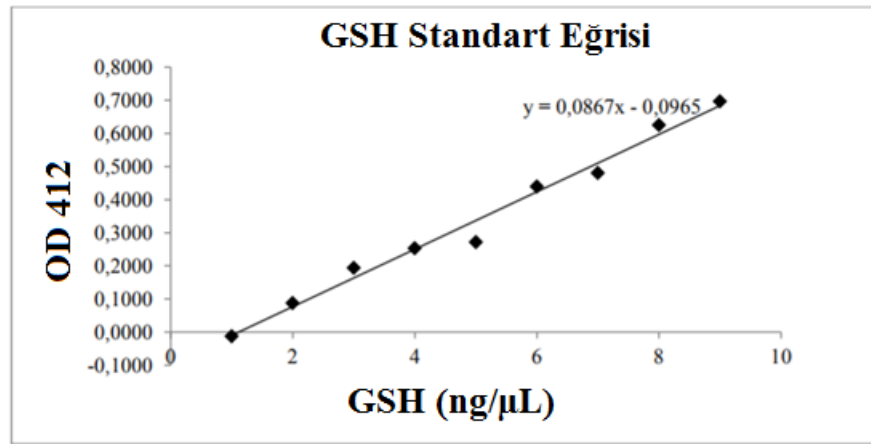
İkinci basamakta ise bir diğer metabolit olan yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) seviyesinin ölçüldüğü basamaktır.

Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) metabolit ölçümü için aşağıdaki sıra takip edildi;

- Her 100 µL’lik homojenat örneği üzerine 8 µL 2-vinilpiridin ilave edilip oda sıcaklığında (15-25°C) 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu basamak indirgenmiş glutasyonun (GSH) yükseltgendiği aşamadır.
- İndirgenmiş glutasyonun (GSH) DTNB (5,5’-dithiobis-(2-nitrobenzoikasıit)) ile konjugasyonu ölçülerek yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) miktarı belirlendi.
- Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) metobalit ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü Çizelge 3.6’da gösterildiği gibi uygulandı.

- 412 nm dalga boyunda 5 dk süreyle absorbansın kinetik değişimi bağlı ölçüm yapıldı.

GSH ve GSSG ölçüm değerlendirmeleri için kullanılan standart eğri grafiği Şekil 3.15’de verildi.

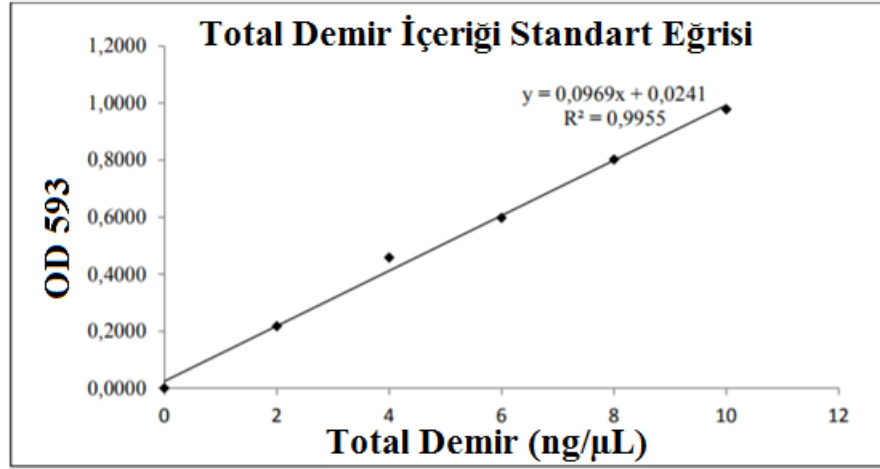


Şekil 3.15. Glutasyon standart grafik eğrisi

3.7. Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Demir İçeriğinin Belirlenmesi

Kontrol grubu ve demir yüklemesi yapılan muamele grubu farelerden alınan karaciğer ve böbrek dokularındaki demir içeriği miktar tayini Sigma Aldrich firmasından alınan kit (MAK025) ve kite ait prosedür uygulandı. 593 nm dalga boyunda mikropate okuyucu (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılarak demir içeriği ölçümü yapıldı. Verilen prosedür doğrultusunda hazırlanan standart grafik ile kullanılacak denklem belirlendi. Total demir konsantrasyonu (S_a) hesaplandıktan sonra numune hacmi (S_v)’ne bölünerek bütün numunelerin konsantrasyonu ayrı ayrı μM olarak hesaplandı.

Total demir içeriği hesaplamalarında kullanılan standart eğri grafiği Şekil 3.16’da gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Total demir içeriği standart eğrisi

3.8. Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi

3.8.1. Western blot analizi

Moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan önemli bir teknik olan western blot, hücrelerden kompleks bir karışım halinde izole edilen proteinlerin ayrılmasına ve kimliklendirilmesine yardımcı olur. Bu teknik 3 aşamada gerçekleştirilir. Birinci aşama, SDS-PAGE üzerinde proteinlerin artı kutba (anot) göç ettirilerek molekül ağırlıklarına göre ayrılmasıdır. İkinci aşama her bir proteinin ayrı ayrı bantlar oluşturduğu katı bir yüzey olan membran üzerine proteinlerin transfer edilmesi ve üçüncü aşama ise hedef proteine uygun olarak tasarlanan primer ve sekonder antikor ile muamele edilen membran üzerinde proteinlerin görselleştirilmesidir (Mahmood and Yang 2012).

Western blot tekniğini oluşturan dört basamak aşağıda verilmiştir;

- SDS-PAGE üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin poliviniliden florit (PVDF) membrana transferi ile gerçekleştirilen blotlama basamağı,

- Spesifik olmayan proteinlerin bağlanmalarını engellemek için PVDF membranda blotlama sonrası bağlanamayan proteinlerin ilgisiz bir proteinle bağlanması ile uygulanan bloklama basamağı,
- Hedef proteine spesifik antikorlarla inkübasyon basamağı,
- Proteinlerin görüntülenme basamağı (Budak vd 2016).

3.8.1.a. Fare karaciğer ve böbrek dokusundan total protein ekstrakte edilmesi

Kontrol ve demir yüklemesi muamele grubu fareler boyunları kırılarak sakrifiye edildi ve longitudinal abdominal insizyon yöntemiyle alınan karaciğer ve böbrek dokuları alikuatlara ayrıldı. Western blot tekniği için kullanılacak protein homojenatı hazırlanana kadar alikuatlar -86°C’de muhafaza edildi.

Protein ekstrakte edilmesi için aşağıdaki sıra izlendi;

- Fare karaciğer ve böbrek dokularına 1:5 oranında RIPA buffer eklendi.
- Dokular BeadBug™ 1,5 veya 3,0 mm boyutundaki zirkonyum ‘beads’ bilyeler kullanılarak homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster™) ile 3000 speed 4 cycle (her cycle 1 dk ve her 1 dk’da 5 sn aralıklarla) olmak üzere parçalandı.
- Homojenatlar 13000 rpm, 4°C’de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı.
- Daha sonra protein ekstraktına Bradford yöntemi uygulanarak miktar tayini yapıldı.

100 mL RIPA tamponuna, 1/50 oranında β -merkaptoetanol ve 1 tablet proteaz inhibitörü ilave edilerek kullanıldı (Budak vd 2016).

3.8.1.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Western blot ile tayin etmek istenilen hedef proteinin molekül ağırlığına uygun olan jel, yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Jel yüzdesi belirlendikten sonra Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9’da gösterildiği gibi yükleme ve ayırma

jeli hazırlandı. Yüklemeden önce konsantrasyon ölçümü Bradford yöntemi ile yapılan proteinlere 1xSDS-PAGE yükleme tamponu (Laemmli Buffer) ilave edildi ve 95°C'lik ısıtma blokunda 10 dk kaynatıldı ve proteinler denatüre edildi. Bu işlemin sonunda proteinler 10 dk buzda inkübe edildi ve yükleme jeline optimize edilen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra 50 Volta 30 dakika jel elektroforezinde yürütüldü. Protein örnekleri jel üzerinde yükleme jelinden ayırma jeline geçmeye başladıklarında voltaj 120 Volta yükseltildi ve yaklaşık 90 dakika yürütülmeye devam edildi (Budak 2016).

Çizelge 3.8. SDS PAGE jel elektroforezi için kullanılan ayırma jeli solüsyon miktarı

Jel Yüzdesi	%8(mL)	%10(mL)	%12(mL)	%14(mL)	%16(mL)
Distile su	6,9	5,9	4,9	3,9	2,9
%30 Akrilamid- Bisakrilamid	4	5	6	7	8
1,5M Tris pH:8,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
%10 SDS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,009	0,006	0,006	0,006	0,006
TOPLAM	15	15	15	15	15

Çizelge 3.9. SDS PAGE jel elektroforezi için kullanılan yükleme jeli solüsyon miktarı

TOPLAM	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5ml
Distile su	0,68	0,14	2,1	2,7	3,4
%30 Akrilamid	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83
1M Tris pH:6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63
%10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,5
%10 APS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,5
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

3.8.1.c. Jeldeki proteinin membrana transferi (blotlama), bloklama ve hedef proteinlerin görüntülenmesi

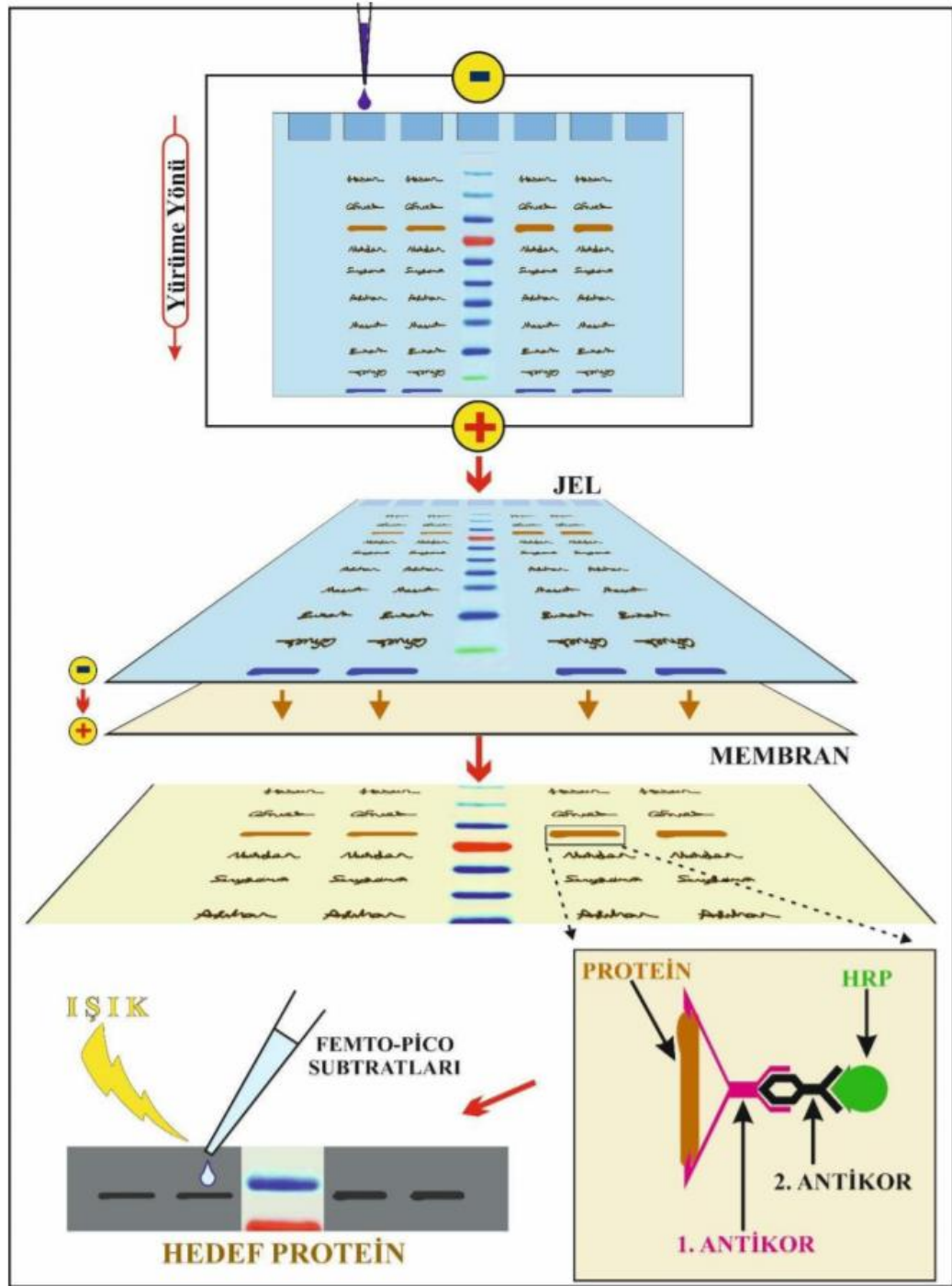
Molekül ağırlıklarına göre SDS-PAGE jelde ayrılan proteinler BioRad TransBlotR TurboTM Transfer System semidry blotter cihazı kullanılarak PVDF membran üzerine transfer edildi.

Tranfer için işlemler aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- Membranlar kullanılmadan 5 dakika metanol ile muamele edildikten sonra 1X Transfer Buffer ile 5 dakika muamele edildi.
- Semidry Blotter cihazına sırası ile 1 adet Whatman blot kağıdı, PVDF membran, jel, 1 adet Whatman blot kağıdı konuldu. 25 Volt 2,5 Amper 7 dakika süreyle blotlama yapıldı.
- Blotlama işlemi bittikten sonra membran 10 dakika TBST ile yıkandı.
- Bloklama çözeltisi (%5 Skim Milk Powder veya %5 Bovine Serum Albumin) ile 1-1:15 saat oda sıcaklığında muamele edildi.
- PVDF membran 4°C'de 1 gece boyunca ya da oda sıcaklığında 1 saat primer antikor ile inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon bittikten sonra 5 kez 5 dakika veya 3 kez 10 dakika TBST ile yıkama yapıldı.
- HRP konjuge edilmiş sekonder antikor oda sıcaklığında 1-1:15 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon işlemi bittikten sonra membran 5 kez 5 dakika ya da 3 kez 10 dakika TBST ile yıkanarak görüntüleme basamağına geçildi.
- Antikorum kimyasal etkileşim ile sinyal oluşturarak ışımaya vermesi için Femto ve Pico substratları (ECL Reagent) kullanıldı.
- BioRad ChemiDoc™ Touch Imaging System cihazı kullanılarak membranın kemilüminesans görüntüsü elde edildi (Budak vd 2016).

Western blot tekniği ile elde edilen hedef proteinler ve housekeeping protein olarak analiz edilen β -Aktin, kemilüminesans sinyal yoğunluğunun sayısal veriler ile belirlenmesinde kullanılan ImageJ software programı kullanılarak değerlendirildi. Deney sonuçlarının güvenilirliği ve deneysel süreçte meydana gelen hataların gözardı edilebilmesi açısından her bir western blot deneyi 3 tekrerrör olarak yapıldı. Deney sonuçlarının istatistiki değerlendirilmesi için daha öncede bahsedilen GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanıldı ve Unpaired t-testi yapılarak p değerleri, $p > 0,05 = ns$ (not significant) önemsiz, $p < 0,05 = *$ (significant) önemli, $p < 0,01 = **$ (very significant) çok önemli, $p < 0,001 = ***$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.



Şekil 3.17. Western blot tekniğinin şematize edilmiş şekilde detaylı görseli (Budak vd 2016)

Çizelge 3.10. Western blot uygulaması için kullanılan primer antikor listesi

Şirket-Kod	Primer Antikor	Protein Moleküler Ağırlığı	Seyreltme Oranı	Bloklama Çözeltisi	Jel Yüzdesi	Primer Antikor İnkübasyon Süresi
Santacruz Sc-28321	TRXR	55-60 kDA	1:1000	%5 BSA Çözeltisi	%12	+4 °C 1 gece
Santa cruz Sc-271237	TXNIP	50-55 kDA	1:1000	%5 BSA Çözeltisi	%12	+4 °C 1 gece
Santa cruz Sc-47778	B-Aktin	35-45 kDA	1:5000	%5 BSA Çözeltisi	%12	+4 °C 1 gece

Çizelge 3.11. Western blot uygulaması için kullanılan sekonder antikor listesi

Şirket-Kod	Şirket-Kod	Seyreltme Oranı	Sekonder Antikor İnkübasyon Süresi
Santa cruz Sc-2005	Goat anti-mouse IgH-HRP	1:10000	Oda Sıcaklığı 1:15 saat

3.9. Spesifik Enzim Aktivitesi Ölçümü

3.9.1. Bradford (Commasie Blue) metodu ile protein tayini

Bradford reaksiyonu Commasie Brilliant Blue G-250, metanol ve fosforik asit içeren bir bileşik olan Bradford çözeltisi ile yaygın olarak kullanılan oldukça duyarlı bir protein tayin yöntemidir. Commasie Brilliant Blue G-250 boyası özellikle arjinin ve aromatik aminoasitler gibi aminoasitlerin asidik ve bazik grupları ile eşleşerek mavi renk oluşumunu sağlar. Oluşan mavi rengin şiddeti proteinin yapısında bulunan aminoasitlere bağlıdır yani proteinin primer yapısı bağlanma oranı açısından önemlidir. Boya herhangi bir aminoasite bağlı olmadığı şartlarda 465 nm dalga boyunda min. absorbans verirken aminoasit ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda max. absorbans verir.

Kontrol ve demir yüklemesi yapılmış fare muamele gruplarından alınan karaciğer ve böbrek dokularında yapılan Bradford yöntemi ile proteinlerin tayini aşağıdaki sıra izlenerek yapıldı;

- Örnek sayısı ve buna ek olarak bir adet kör için en az 5 mL’lik cam tüpler hazırlandı.
- Örnekler 10 µL homojenat + 90 µL saf su olacak şekilde 1:10 oranında seyreltildi.
- Her bir cam tüpe çizelge de gösterildiği gibi Bradford çözeltisi ve örnek eklendi.

Çizelge 3.12. Bradford (Coomassie Blue) protein tayini metodunda uygulama prosedürü

Kimyasallar	KÖR(µL)	NUMUNE(µL)
dH ₂ O	100	-
Süpernatant	-	100
Bradford Çözeltisi	4900	4900
Toplam Hacim	5000	5000

- Tüpler önce kısa süre vorteks edildi ve ardından oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda her bir tüp 595 nm dalga boyunda köre karşı ölçüldü.
- Elde edilen sonuçlar bu homojenatlar ile yapılan bütün EU/mg hesaplamalarında kullanıldı.

3.9.2. Tioredoksin redüktaz (TRXR) spesifik enzim aktivitesi ölçümü

Tioredoksin Redüktaz enziminin aktivite ölçümü için gerekli olan homojenat hazırlama prosedüründe, kontrol ve demir yüklemesi yapılan fare muamele grubundan alınan karaciğer ve böbrek dokularından yaklaşık olarak 0,03 g tartılan dokuların 5 katı kadar homojenat tamponu (100 mM pH:7 olan K-fosfat tamponu) ile homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) kullanılarak 3000 speed 5 cycle her cycle 1 er dakika olmak üzere homojenize edildi. Homojenatlar 13000 rpm de 30 dakika +4°C’de

santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve aşağıda görülen Çizelge 3.13'deki Tiyoredoksin Redüktaz enzim aktivite ölçüm prosedürü izlendi;

Çizelge 3.13. TRXR spesifik enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR(μL)	NUMUNE(μL)
100 mM K-fosfat Tamponu (10 mM EDTA'lı)	200	200
%1'lik Etanol	100	100
0,2 mg/ml BSA	100	100
Süpernatant	-	10
dH ₂ O	400	390
0,2 mM NADPH	100	100
5 mM DTNB	100	100
Toplam Hacim	1000	1000

Tiyoredoksin Redüktaz enzim aktivitesi yukarıda gösterilen pipetleme prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi ve 412 nm dalga boyunda 1 mL'lik kuvarz küvetler kullanılarak her biri 3 dakika 3 kez ölçüm yapıldı ve absorbanslar kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak enzim aktivitesi (EU/mL) hesaplandı. Daha sonra protein tayini sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite(EU/mg)} = \text{Abs} \div (\varepsilon \times t) \times Vt \div Vö \times Sf \times (1 \div mg \frac{\text{protein}}{\text{ml}})$$

Abs : 412 nm'de ölçülen absorbans değeri

ε : 412 nm'de 1 mM NADPH'in ekstinksiyon katsayısı

t : Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı

Vt : Toplam hacim

Vö : Kullanılan örnek hacmi

Sf : Seyreltme faktörü

3.9.3. Glutasyon redüktaz (GR) spesifik enzim aktivitesi ölçümü

Glutasyon Redüktaz enzimi aktivite ölçümünde, kontrol ve demir yüklemesi yapılan muamele grubu farelerden alınan karaciğer ve böbrek dokuları tartıldı ve 5 katı kadar homojenat tamponu (1 mM DDT, 1 mM EDTA ve 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris HCl) eklendi. Ardından homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) kullanılarak 3 kez 3 dk (her dakika sonunda 5-10 sn buzda bekleterek) parçalama yapıldı ve 1 saat +4°C’de 13500 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatantlar alındı ve aşağıda görülen Çizelge 3.14’deki prosedür izlendi;

Çizelge 3.14.GR spesifik enzim aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR(μL)	NUMUNE(μL)
1 M K-fosfat Tamponu pH:7,5	200	200
dH ₂ O	600	590
Homojenat	-	10
20 mM GSSG	100	100
20 mM NADPH	100	100
Toplam Hacim	1000	1000

Glutasyon Redüktaz enzim aktivitesi yukarıda gösterilen pipetleme prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi ve 340 nm dalga boyunda 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak her biri 3 dakika 3 kez ölçüm yapıldı ve absorbanslar kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak enzim aktivitesi (EU/mL) hesaplandı. Daha sonra protein tayini sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite(EU/mg)} = \text{Abs} \div (\varepsilon \times t) \times Vt \div V\ddot{o} \times Sf \times (1 \div mg \frac{\text{protein}}{\text{ml}})$$

Abs : 340 nm’de ölçülen absorbans değeri

ε : 340 nm’de 1 mM NADPH’ın ekstinksiyon katsayısı

t : Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı

V_t : Toplam hacim

V_ö : Kullanılan örnek hacmi

S_f : Seyreltme faktörü

3.9.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) Spesifik Enzim Aktivitesi Ölçümü

Glutasyon Peroksidaz enzimi aktivite ölçümü için gerekli olan homojenatlar kontrol ve demir yüklemesi yapılan muamele grubu farelerden alınan karaciğer ve böbrek dokuları Glutasyon Redüktaz enzimi aktivite ölçümü homojenat hazırlama prosedürüne göre yapıldı. Elde edilen homojenatların aşağıda görülen Çizelge 3.15’deki prosedüre göre ölçümü yapıldı.

Çizelge 3.15. GPx spesifik enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR(μL)	NUMUNE(μL)
1 M K-fosfat Tamponu (pH:8,0)	100	100
dH ₂ O	580	590
20 mM GSH	100	100
10 EU/ml GR	100	100
2 mM NADPH	100	100
Homojenat	10	10
t-bst Hprx	-	10
Toplam Hacim	1000	1000

Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi yukarıda gösterilen pipetleme prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi ve 340 nm dalga boyunda 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak t-bst Hprx’e kadar pipetleme yapıldı ve 5 ila 10 dakika boyunca ölçüm yapılarak absorbans değişiminin sabitlenmesi beklendi. Absorbans değeri sabitlenince hızlı bir şekilde kuvarz küvetlere t-bst Hprx eklendi ve her biri 3 dakika 3 kez 340 nm dalga

boyunda ölçüm yapıldı ve absorbanslar kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak enzim aktivitesi (EU/mL) hesaplandı. Daha sonra protein tayini sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite (EU/mg)} = Abs \div (\varepsilon \times t) \times Vt \div V\ddot{o} \times Sf \times (1 \div mg \frac{protein}{ml})$$

Abs : 340 nm’de ölçülen absorbans değeri

ε : 340 nm’de 1 mM NADPH’in ekstinksiyon katsayısı

t : Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı

Vt : Toplam hacim

Vö : Kullanılan örnek hacmi

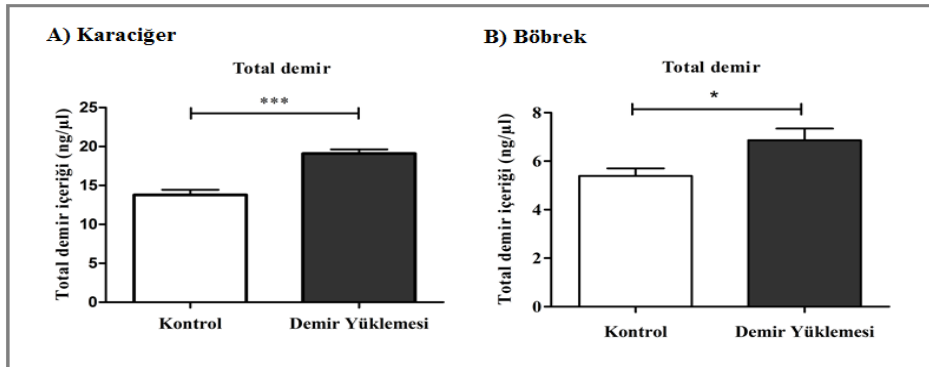
Sf : Seyreltme faktörü

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırmaya yönelik kontrol ve demir yüklemesi modeli oluşturulan muamele grubu fare karaciğer ve böbrek dokusunda önemli bir enzimatik antioksidan olan Tioredoksin sistem üyeleri, tioredoksin (TRX), tioredoksin redüktaz (TRXR) ve tioredoksin ilişkili protein (TXNIP) kantitatif gen ve protein seviyesinde değişimleri incelendi. Ayrıca organizmada demir homeostazisinde görevli Hamp, Fpn, Fth genlerinin kantitatif gen ekspresyon profilleri incelendi ve yapılan demir yüklemesinin farelerde demir homeostazisini nasıl etkilediği araştırıldı. Oksidatif stres ve antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulduğu taktirde miktarı değişen markır niteliğindeki bazı metabolit seviyelerindeki değişimleri araştırıldı. Antioksidan sistem için önemli bazı proteinlerin kantitatif protein ekspresyon seviyesini belirlemek için spesifik enzim aktivitesi tayini yapıldı.

4.1. Karaciğer ve Böbrek Dokusunda Kantitatif Demir İçeriğinin Belirlenmesi

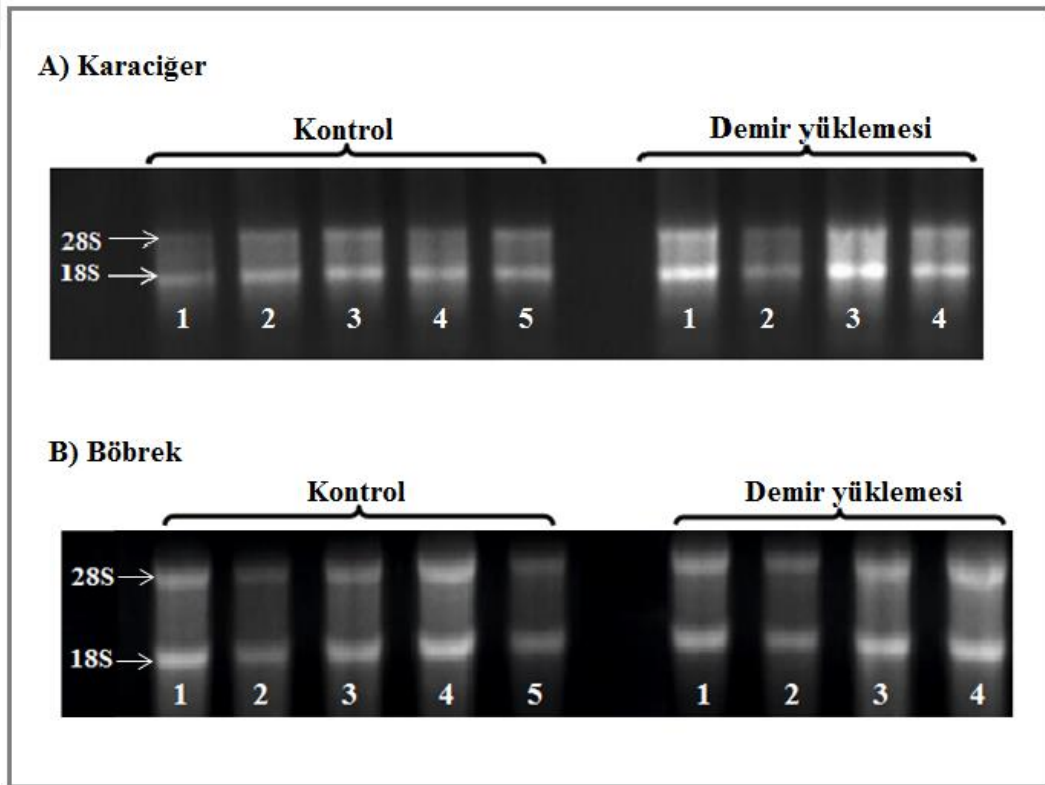
Araştırmaya yönelik olarak kontrol ve muamele grubu farelerden alınan karaciğer ve böbrek dokusundaki kantitatif demir içeriği Demir Ölçüm Kiti (MAK025) kullanılarak spektroskopik olarak belirlendi. Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman karaciğer ($p<0,001$) ve böbrek dokusunda ($p<0,05$) artış belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda total demir içeriğinin belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda total demir içeriğinin belirlenmesi

4.2. Total RNA İzolasyon Analizi

Kontrol ve muamele grubu farelerden alınan karaciğer ve böbrek dokusundan PureLink™ RNA Mini Kiti (Ambion by Life Technologies) kullanılarak total RNA izole edildi. Elde edilen total RNA agaroz jelde yürütüldü. 28S RNA ve 18S RNA'nın izolasyonundan elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Ribozomal RNA'nın izole edildiğinin gösterilmesi, mRNA'nın da başarılı bir şekilde izole edildiğinin göstergesidir.



Şekil 4.2. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusundan izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusundan izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda nanodrop cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda ölçüldü ve saflık dereceleri 260/280 oranı ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Kontrol ve muamele

grubu fare karaciğer ve böbrek dokularından izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon miktarları ve saflık dereceleri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusundan elde edilen total RNA saflık ve konsantrasyon miktarı

Deney Grupları	RNA Saflık (A_{260}/A_{280})	RNA Konsantrasyon (ng/ μ l)
Kontrol 1	2,0	2207
Kontrol 2	2,1	1948
Kontrol 3	1,9	1527
Kontrol 4	1,9	1168
Kontrol 5	2,1	1792
Demir Yükleme	2,2	1501
Demir Yükleme	2,1	1100
Demir Yükleme	2,0	1408
Demir Yükleme	2,1	1385

Çizelge 4.2. Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusundan elde edilen total RNA saflık ve konsantrasyon miktarı

Deney Grupları	RNA Saflık (A_{260}/A_{280})	RNA Konsantrasyon (ng/ μ l)
Kontrol 1	1,9	2055
Kontrol 2	1,9	2027
Kontrol 3	2,0	1996
Kontrol 4	2,0	1504
Kontrol 5	2,1	1628
Demir Yükleme	2,2	1304
Demir Yükleme	1,9	2103
Demir Yükleme	2,0	1856
Demir Yükleme	2,1	1765

İzole edilen total RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA’lar Bio-Rad C1000TM Thermal Cycler cihazı yardımıyla New England BioLabs ProtoScript First Strand cDNA sentez kitinde bulunan protokole uygun gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’ların konsantrasyonu nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü ve cDNA konsantrasyonları eşitlendi.

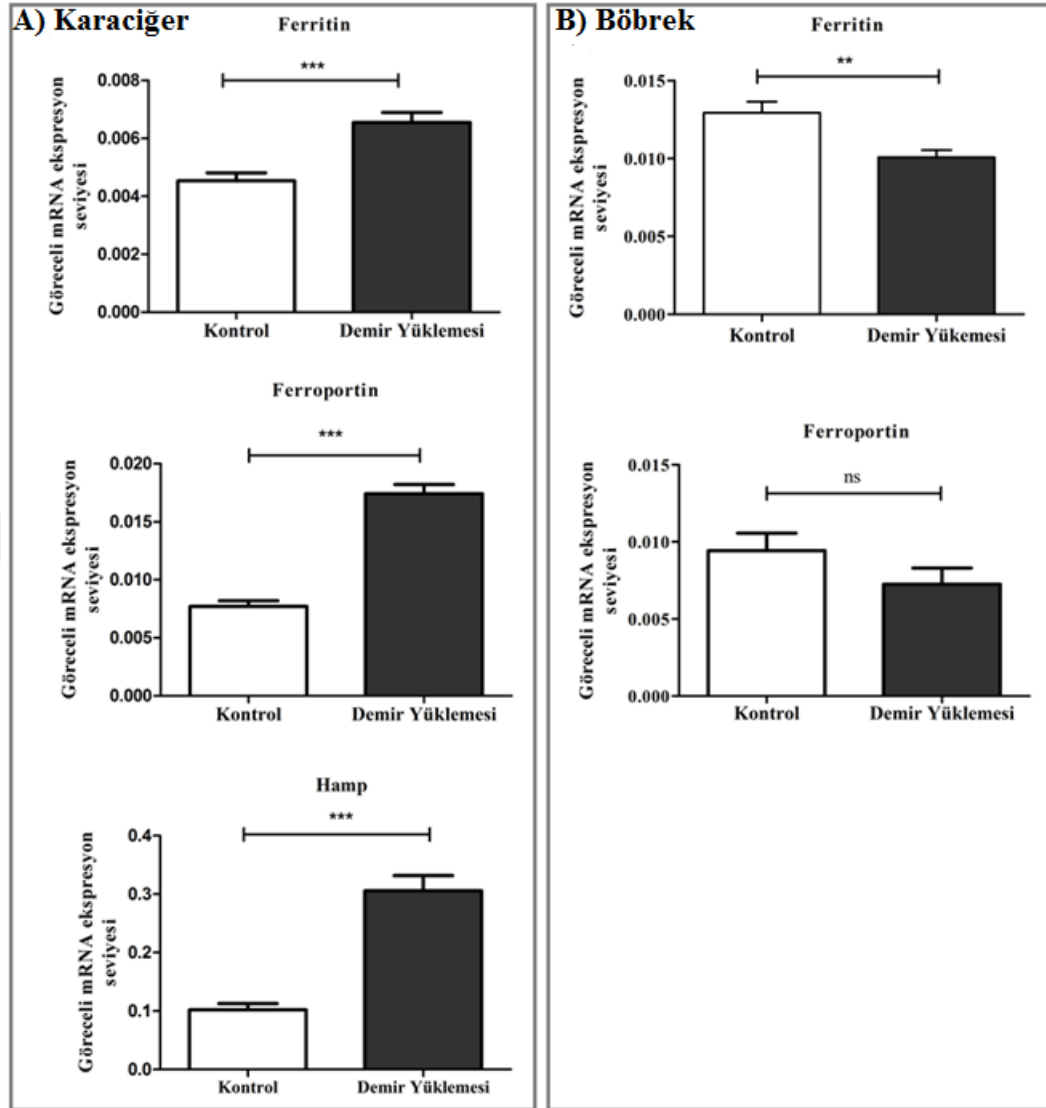
4.3. Real Time PCR Analizi Sonuçları

4.3.1. Karaciğer ve böbrek dokularında demir metabolizması markır genlerinin kantitatif gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer ve böbrek dokusunda demir homeostazisinin sağlanmasında kilit rol oynayan, Hepsidin (Hamp), Ferritin (Fth), Ferroportin (Fpn) kantitatif gen ekspresyon seviyesi incelendi. Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda Hamp, Fth ve Fpn genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman muamele grubunda ($p<0,001$) artış tespit edildi. Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda Fth ve Fpn genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman muamele grubunda Fth geninde ($p<0,01$) azalış tespit edilmiş, Fpn geninde ise ($p<0,05$) değişim gözlemlenmedi (Şekil 4.3).

Hepsidin demir homeostazisi, inflamasyon, enfeksiyon ve metabolik sinyallerin düzenlenmesini sağlayan antimikrobiyal bir peptittir. İnsanlarda Hepsidin, HAMP geni tarafından hem demir düzenleyen hem de akut faz proteini olarak akut ve kronik inflamasyon durumunda sitokinler ve en çokta interlökin-6 (IL-6) etkisi ile karaciğerde sentezlenen bir proteindir (Pigeon *et al.* 2001).

Karaciğerde eksprese olan bir gen olduğu için böbrek dokusundan elde edilen cDNA örneklerinde Hamp geninin Real Time PCR analizi herhangi kaydadeğer bir sonuca varılamayacağı için gerçekleştirilmedi.

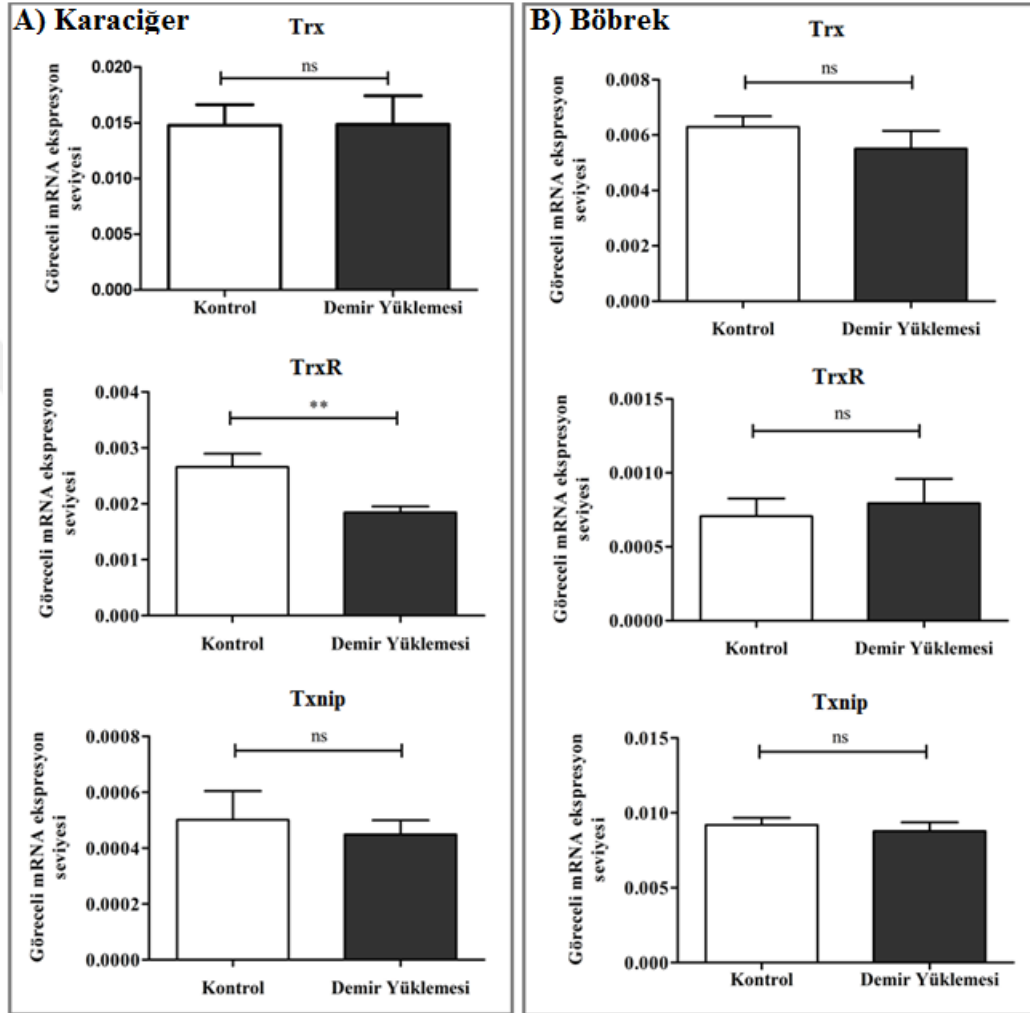


Şekil 4.3. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda Fth, Fpn ve Hamp genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda Fth ve Fpn genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi

4.3.2. Antioksidan sistem üyesi olan Tioredoksin sistem markır genlerinin (Trx, TrxR) kantitatif gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Antioksidan sistem yolağında önemli role sahip Tioredoksin sistem genlerinin fare karaciğer dokusunda Trx ve böbrek dokusunda Trx, TrxR mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman muamele grubunda ($p < 0,05$) değişim tespit

edilmemiştir. Karaciğer dokusunda TrxR geninde ise kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman muamele grubunda ($p<0,01$) azalış tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

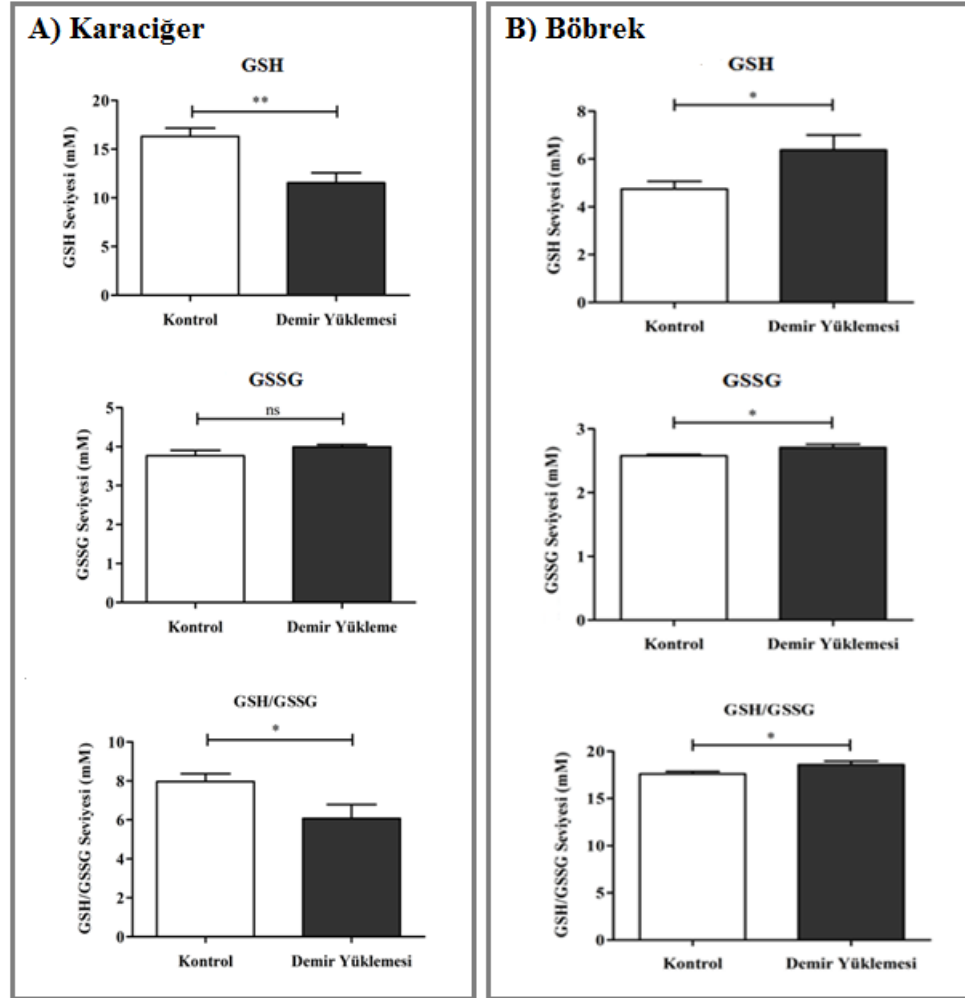


Şekil 4.4. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusundaki Trx, TrxR ve Txnip genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusundaki Trx, TrxR ve Txnip genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR uygulaması ile belirlenmesi

4.4. Antioksidan Bağıntılı Bazı Metabolitlerin Ölçüm Sonuçları

Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve indirgenmiş glutatyon yükseltgenmiş glutatyon oranı (GSH/GSSG) seviyeleri ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman

muamele grubunda, GSH miktarında ($p<0,01$) azalış, GSH/GSSG miktarında ($p<0,05$) azalış tespit edilmiştir, GSSG miktarında ise ($p<0,05$) değişim tespit edilememiştir. Böbrek dokusunda kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman muamele grubunda, GSH, GSS ve GSH/GSSG miktarında ($p<0,05$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

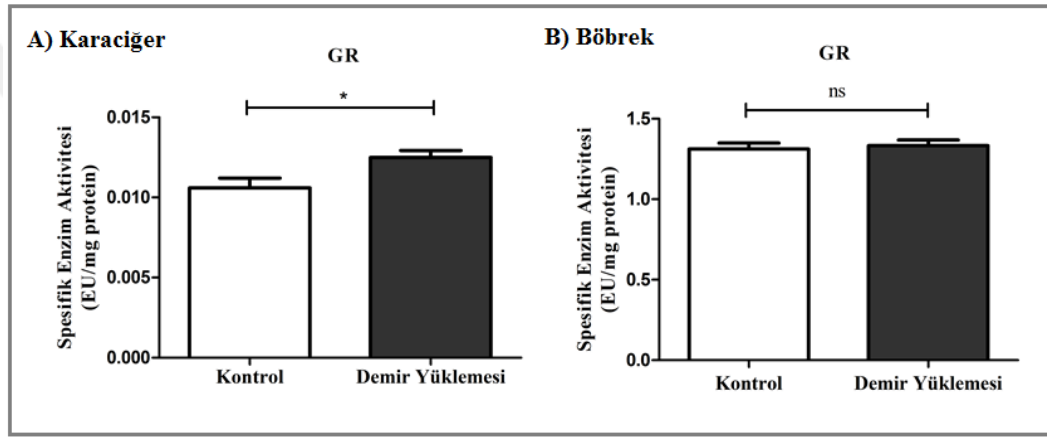


Şekil 4.5. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda GSH, GSSG ve GSH/GSSG metabolit seviyelerinin belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda GSH, GSSG ve GSH/GSSG metabolit seviyelerinin belirlenmesi

4.5. Spesifik Enzim Aktivitesi Sonuçları ve Analizleri

4.5.1. Glutasyon redüktaz (GR) spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi

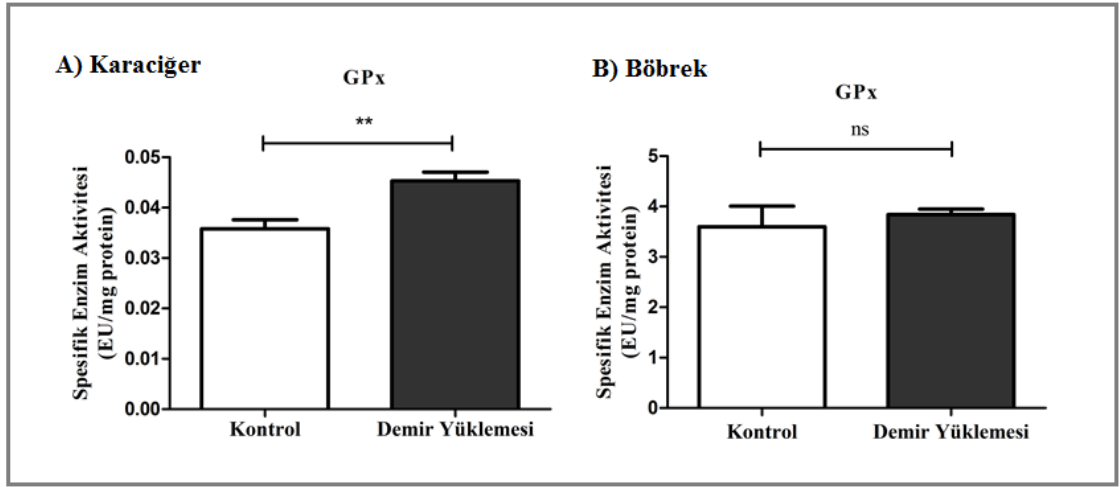
Glutasyon redüktaz spesifik enzim aktivitesi muamele grubu farelerde kontrol grubuyla kıyasla karaciğer dokusunda ($p<0,05$) artış gözlemlenmiş, böbrek dokusunda ($p<0,05$) değişim tespit edilememiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A) Kontrol ve demir yüklemesi yapılmış muamele grubu fare karaciğer dokusunda GR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi, **B)** Kontrol ve demir yüklemesi yapılmış muamele grubu fare böbrek dokusunda GR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi

4.5.2. Glutasyon peroksidaz (GPx) spesifik enzim aktivitesinin belirlenmesi

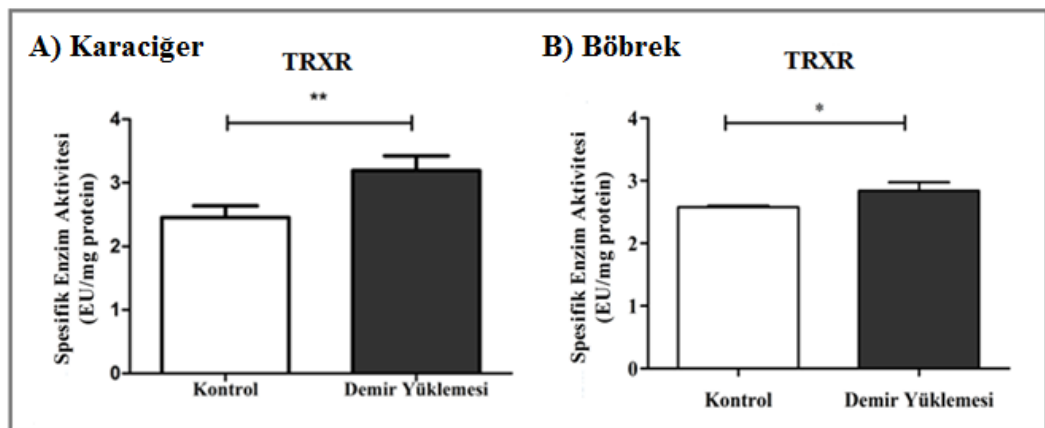
Glutasyon peroksidaz spesifik enzim aktivitesi muamele grubu farelerde kontrol grubuyla kıyasla karaciğer dokusunda ($p<0,01$) artış gözlemlenmiş, böbrek dokusunda ($p<0,05$) değişim tespit edilmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda GPx spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda GPx spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi

4.5.3. Tioredoksin redüktaz (TRXR) spesifik enzim aktivitesi sonuçları

Tioredoksin redüktaz spesifik enzim aktivitesi muamele grubu farelerde kontrol grubuyla kıyasla karaciğer dokusunda ($p<0,01$) artış, böbrek dokusunda ($p<0,05$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

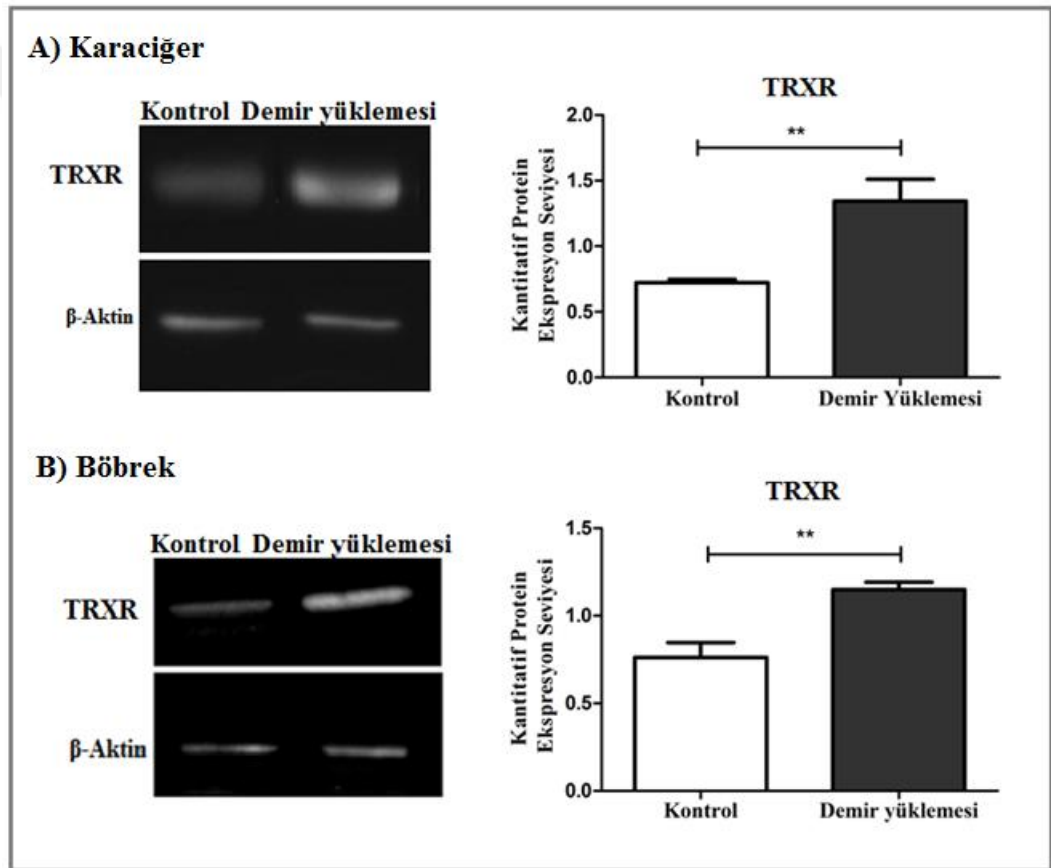


Şekil 4.8. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda TRXR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda TRXR spesifik enzim aktivitesi belirlenmesi

4.6. Kantitatif Western Blot Analizi Sonuçları

4.6.1. Tioredoksin redüktaz (TRXR) proteininin western blot analizi sonuçları

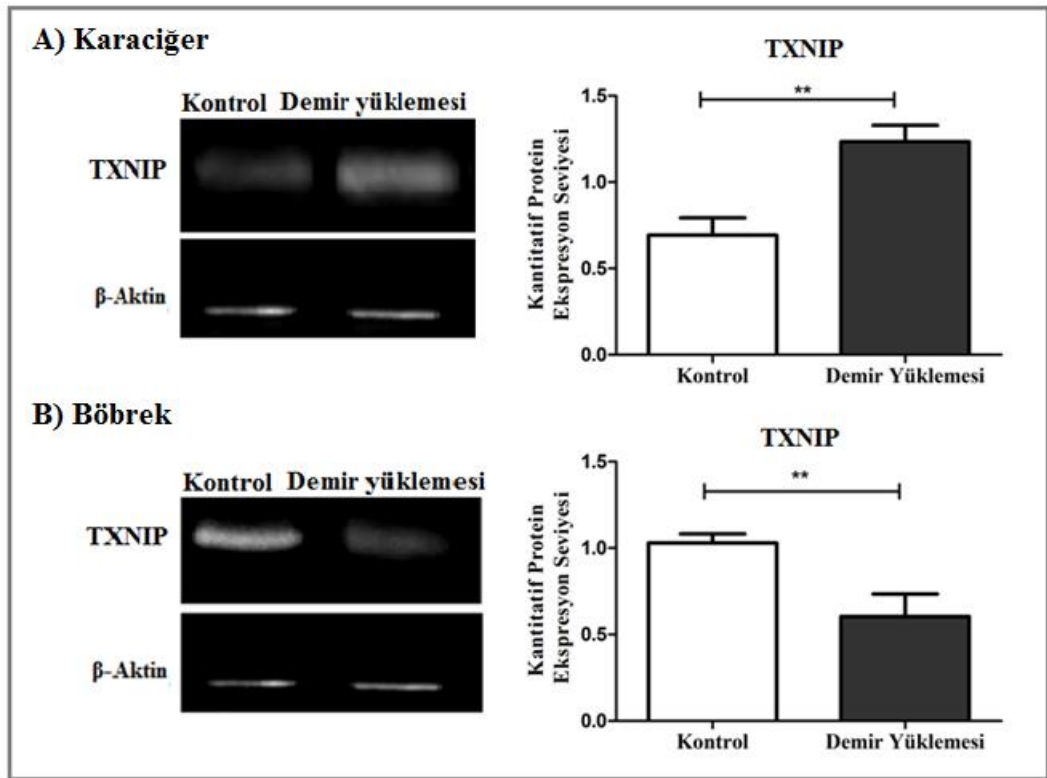
Tioredoksin redüktaz (TRXR) protein ekspresyon seviyesi karaciğer ve böbrek dokusunda muamele grubu, kontrol grubu ile kıyasla ($p < 0,01$) artış tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda TRXR protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda TRXR protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi

4.6.2. Tioredoksin ilişkili protein (TXNIP) western blot analizi sonuçları

Tioredoksin ilişkili protein (TXNIP) ekspresyon seviyesi fare karaciğer dokusunda muamele grubu, kontrol grubu ile kıyasla ($p<0,01$) artış, böbrek dokusunda kontrol grubu ile kıyasla ($p<0,01$) azalış tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. A) Kontrol ve muamele grubu fare karaciğer dokusunda TXNIP protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi, **B)** Kontrol ve muamele grubu fare böbrek dokusunda TXNIP protein ekspresyon seviyesinin western blot tekniği ile belirlenmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücrelerde çeşitli endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere serbest radikal türleri (ROS) oluşumu meydana gelmektedir. ROS'lar hücrede normal koşullarda belirli miktarlarda bulunmaktadır ve buda antioksidan sistemin yabancı moleküller karşı aktif tutulmasını sağlamaktadır. Ancak aşırı ROS üretimi antioksidan sistem ve pro-oksidanların arasındaki dengenin bozulup pro-oksidanların çoğalmasına sebep olmaktadır. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum neredeyse bütün hastalıkların temel sebebidir. ROS'ların hücrelerdeki DNA, RNA, protein ve lipitler gibi makromoleküllerin yapılarını bozarak organizmada inflamasyona, aşırı hücre bölünmesine, yaşlanmalara, nöredejeneratif hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Ancak organizmadaki temel antioksidanlardan olan Tiyoredoksin sistem ve Glutasyon sistem, hücresel ROS temizleyicileri olarak adlandırılmakta ve moleküller ile tiholdisülfüt etkileşimine gerek oksidasyon sürecinde makromoleküllerin hasara uğramasını önlemektedirler (Koharyova and Kolarova 2008; Budak *et al.* 2014a).

Demir hücrede pro-oksidanların oluşmasında ve antioksidan sistemin dengede tutulmasında rol oynayan önemli bir elementir. Ancak demir miktarı aşırı artış gösterdiği zaman pro-oksidanlar artmakta ve hücresel makromoleküllere zarar vermektedir (Meneghini 1997). Bu sebeple demir metabolizması organizmada hassas bir şekilde kontrol edilmektedir ve ana düzenlenmesi karaciğerde eksprese olan hepsidin (Hamp) hormonu ile sağlanmaktadır. Demirin hücrede depo edilmesi ve ihtiyaca göre kana verilmesi ise ferritin (Fth) ve ferroportin (Fpn) moleküller ile gerçekleştirilmektedir (Pantopoulos *et al.* 2012).

Bu çalışmada demir yüklemesi modelini oluşturmak için BALB/c ırkı erkek fare kullanıldı. Farelerden alınan karaciğer ve böbrek dokularında demir yüklemesi modelinin oluşup oluşmadığı kantitatif ve moleküler olarak belirlendi. Kantitatif olarak demir içeriğinin belirlenmesinde spektroskopik yöntem kullanıldı. Elde edilen sonuçlar demir içeriğinin muamele grubunda kontrol grubuna kıyasla her iki dokuda da artış gösterdiği belirlendi. Ayrıca demir homeostazisinde markır olduğu bilinen ve demir

düzeyi ile doğru orantılı olarak ekspresyonu artan Hamp geninin kantitatif ekspresyon seviyesi karaciğerde incelendi ve kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış tespit edildi. Hamp geni sadece karaciğer dokusunda eksprese olduğu için böbrekte kantitatif ekspresyon analizi yapılmadı.

Yapılan çalışmalarda demir yüklemesinin hepsidin ekspresyon seviyesi artırarak hücre dışı demir döngüsünü normal düzeyde devam etmesine katkı sağlamaktadır. Demir eksikliğinde ise hepsidin ekspresyonunun azaldığı, ferroportin yoluyla plazmaya daha fazla demir çıkışı sağlandığı ve dolaşımda demir miktarının arttığı tespit edilmiştir (Nemeth and Ganz 2006; Budak *et al.* 2014a).

Bizim çalışmamızda sistemik demir yüklemesi yaptığımız fare karaciğer dokusunda ferroportin ekspresyon miktarındaki artış literatür ile benzerlik göstermektedir ancak böbrek dokusunda ferroportin miktarında değişim tespit edilememiştir.

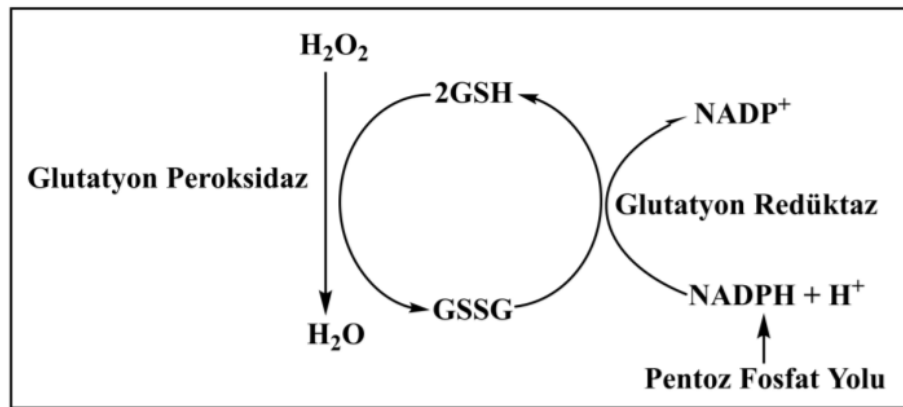
Başka bir çalışmada artan hemoglobin ve artan eritrositlerin serum ferritin düzeyinde artış meydana getirdiği tespit edilmiştir. Anemi hastalarında ise normal veya artan ferritin miktarı düşük hemoglobin ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca karaciğer yağlanması insülin direnci ve hepatik demir birikimi meydana gelmekte ve neticesinde ferritin ekspresyonunda artış görülmektedir (Fiorelli 2007). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda karaciğer dokusunda muamele grubunda kontrol grubu ile kıyasla tespit edilen ferritin geninin kantitatif ekspresyon seviyesindeki artış literatür ile uyum gösterirken böbrek dokusunda muamele grubunda kontrol grubu ile kıyasla ferritin geninin kantitatif ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmiştir.

ROS seviyesindeki artış ya da antioksidan sistem yetersizliği sinyal iletim yolları, apoptozis ve hücresel bileşenlere zarar vererek oksidatif stresi meydana getirir (Dağdelen 2015). Circu *et al.* (2012) post-oksidanlara maruz kalma sonucu, GSH/GSSG redoks durumunda iyileşme olan hücrelerin apoptozisten kaçamadığını belirtmiştir. Hücre membranında apoptotik sinyal oluşumu ile GSH dışarı sızıntısı arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılamamıştır. GSH sızıntısının ROS üretimi ile ilişkisi

bilinmekte ve çoğu çalışmada ROS kaynaklı oksidatif hasarın apoptotik sinyal aktivasyonu ile bağlantılı olduğu da kanıtlanmıştır (Circu and Aw 2012). Literatürde belirtilen birçok çalışmada toplam glutatyon indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve GSH/GSSG miktarlarındaki artış veya azalışların oksidatif stres oluşturduğu gösterilmiştir (Gülçin *et al.* 2009; Reiter *et al.* 2009; Budak *et al.* 2014a)

Bu tez çalışmasında karaciğer dokusunda azalan GSH miktarı ve değişmeyen GSSG miktarı ve azalan GSH/GSSG miktarı yapılan demir yüklemesinin dokuda oksidatif stres meydana getirdiğini göstermektedir. Böbrek dokusunda artan GSH, GSSG ve GSH/GSSG miktarı ise oksidatif stresin oluştuğunun kanıtı niteliğindedir.

Pentoz fosfat yolunun amacı NADPH üretmektir. NADPH'ın amacı ROS'ların glutatyon ve tiyoredoksin sistem aracılığı ile azaltılmasını sağlamaktır. Glutatyon redüktaz (NADPH: GSSG oksidoredüktaz) enziminin en önemli hedefi indirgenmiş glutatyon (GSH)/ yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oranını korumaktır. Bu oran eritrositlerde yaklaşık 500/1 oranındadır ve bu oran düştüğü zaman eritrositler hemolize uğramaktadır (TEMEL *et al.*). Bu tez çalışmasında karaciğer dokusunda GR spesifik enzim aktivitesi seviyesi spektroskopik olarak incelenmiş ve muamele grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman önemli derecede artış belirlenmiştir. Böbrek dokusunda ise muamele grubunda kontrol grubuyla kıyasla bir değişim gözlenememiştir.



Şekil 5.1. Glutatyon metabolizmasında görevli enzimler ve metabolitler (Dağdelen 2015)

Glutasyon peroksidaz (GPx), hücreleri hidrojen peroksitten (H_2O_2) kaynaklanan oksidatif hasara karşı korumaktadır. GPx, elektron kaynağı olarak GSH’kullanarak H_2O_2 ’yi ve diğer radikalleri metabolize etmektedir (Karabulut and Gülay 2016). Dağdelen (2015) tarafından yapılan tez çalışmasında lipopolisakkarit (LPS) ile muamele edilen farelerde inflamasyonun oksidatif stresin üzerindeki etkisi araştırılmış ve GPx spesifik enzim aktivitesi miktarında önemli derecede artış tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında karaciğer dokusunda muamele grubunda kontrol grubuyla kıyasla GPx spesifik enzim aktivitesi miktarında önemli derecede artış belirlenmiştir. Böbrek dokusunda ise herhangi bir değişim belirlenmemiştir.

Kang (2008) *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerine intraselüler demir transferi yaparak iki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometre tekniği ile tiyoredoksin redüktazın (TRXR) demir bağlama özelliği ile sitozolik demiri bağlayarak iletimini sağladığını saptamıştır (Kang *et al.* 2008). Ayrıca TRXR oksidatif stres durumunda TRX miktarını korumak ve artırmak için NADPH’ı kullanarak TRX’i aktive etmektedir. (Messner *et al.* 2012). Bu tez çalışmasında yapılan spektroskopik incelemelerde ise TRXR spesifik enzim aktivitesi miktarında karaciğer ve böbrek dokusunda önemli derecede artış tespit edilmiştir. Tiyoredoksin sisteminin inhibisyonu antioksidan sistem moleküllerin, baskılamakta ve ROS miktarında artışa sebep olmaktadır (Gitler *et al.* 2002). Bu sonuçları desteklemek amacıyla yapılan western blot analizinde ise karaciğer dokusunda TRXR ve TXNIP’in kantitatif protein ekspresyon analizinde muamele grubunda kontrol grubu ile kıyasla önemli derecede artış tespit edilmiştir. Böbrek dokusunda ise TRXR kantitatif protein ekspresyon seviyesinde önemli derecede artış, TXNIP kantitatif protein ekspresyon seviyesinde ise önemli derecede azalış tespit edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde meydana gelen oksidatif stresin hücreye verdiği hasara engel olmak için artan tiyoredoksin sistem aktivitesi organizmanın bir savunma geliştirdiğini göstermiştir.

Oksidatif sistemin canlıya etkisini araştıran bir grup araştırmacı, hipertansiyonlu sıçanlarda böbrek ve kalp dokularında Trx kantitatif gen ekspresyon seviyelerini incelemiş ve normal sıçanlara kıyasla hipertansiyonlu sıçanların Trx kantitatif gen

ekspresyon seviyelerinde yaklaşık olarak iki kat artış tespit etmişlerdir (Tanito *et al.* 2004). Schulze (2004) tarafından yapılan çalışmada ise oksidatif stres durumunda Txnip'in kantitatif gen ekspresyonunun artışı sonucu Trx aktivasyonunu baskıladığı ve oksidatif stresi artırdığı kanıtlanmıştır (Schulze *et al.* 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli kanser tiplerinde agresif tümörlerde eş zamanlı olarak Trx ve TrxR kantitatif gen ekspresyonunda artışı tespit edilmiştir (Lincoln *et al.* 2003). Ancak yapılan tez çalışmasında bu bulguların aksine böbrek dokusunda tiyoredoksin sistem genleri olan Trx, TrxR kantitatif gen ekspresyon seviyeleri Real Time PCR ile incelenmiş ve önemli bir değişim tespit edilmemiştir. Karaciğer dokusunda ise TrxR kantitatif gen ekspresyon seviyesinde önemli derecede azalma, Trx kantitatif gen ekspresyon seviyelerinde ise önemli bir değişim belirlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar farelere yapılan demir yüklemesinin tiyoredoksin sistemin, gen ekspresyon seviyesinde değişime sebep olmayıp post-translasyonel modifikasyonlar ile düzenlendiği fikrini oluşturmuştur. Holmes (2005) tarafından yapılan çalışmada hücrelerdeki demirin, demir homeostazisinde görevli çeşitli protein ve bazı antioksidan sistem protein miktarını transkripsiyonel ve translasyonel olarak etkilediği tespit edilmiştir (Holmes *et al.* 2005). Altun (2018) tarafından yapılan tez çalışmasında demir yüklemesi durumunda fare kalp dokusunda tiyoredoksin sistem genleri olan Trx, TrxR kantitatif ekspresyon seviyesinde önemli bir değişim tespit edilmemiştir (Altun 2018). Bu bilgiler ışığında hücredeki demir içeriğinin tiyoredoksin sistemi gen seviyesinde etkilemediği ancak hücredeki TRX, TRXR miktarını translasyonel seviyede etkilediği düşünülmüştür.

Sonuç olarak;

I. Farelere yapılan sistemik demir yüklemesi modelinin oluşturulduğu karaciğer ve böbrek dokusunda spektroskopik yöntem kullanılarak gösterildi. İki dokuda da artan total demir miktarı hücrede biriken fazla demirin toksik seviyede olduğunun göstergesidir.

II. Demir yüklemesi durumunda karaciğer dokusunda demir homeostazisinde görevli Hamp, Fth ve Fpn genlerinin kantitatif ekspresyon seviyesinde tespit edilen artış bu

dokuda demir içeriğinin aşırı miktarlara ulaştığının göstergesidir. Böbrek dokusunda ise Fth geni kantitatif ekspresyon seviyesinde azalma, Fpn geni kantitatif ekspresyon seviyesinde ise değişim görülmemesi böbrek hücrelerine alınan fazla demirin depo edilmediği ve dokudan uzaklaştırılmak istendiğinin göstergesidir.

III. Demir yüklemesi sonucu ROS artışı oksidatif stres belirteci olan GSH, GSSG ve GSH/GSSG seviyelerinde karaciğer ve böbrek dokularında önemli derecede değişim gösterdi.

IV. Demir yüklemesi yapılmış karaciğer dokusunda GPx ve GR spesifik enzim aktivitesi miktarında önemli derecede artış tespit edildi. Bu sonuç karaciğer dokusunda demir yüklemesinin oluşturduğu ROS miktarının aşırı boyutlarda olduğu ve antioksidan sistemin aktivitesinin arttığını göstermektedir. Böbrek dokusunda GPx ve GR spesifik enzim aktivitesi miktarında değişim görülmedi. Elde edilen bu sonuç ise böbrek dokusunda glutatyon sistemin GR ve GPx üzerinden devreye girmediğini göstermiştir.

V. Tiyoredoksin sistem genleri Trx, TrxR kantitatif ekspresyon seviyelerinde karaciğerde Trx ekspresyonunda değişim gözlenmemiş ancak TrxR ekspresyonunda azalış tespit edilmiştir. Bu sonuç dokuda ROS artışı sonucu TrxR ekspresyonun baskılandığı düşünülmüştür. Böbrek dokusunda ise Trx, TrxR kantitatif ekspresyon seviyelerinde bir değişim görülmemiştir.

VI. Demir yüklemesi sonucu karaciğer ve böbrek dokusunda TRXR spesifik enzim aktivitesi miktarında önemli derece artış tespit edilmiştir ki bu sonuçlar iki dokuda da antioksidan sistemin tiyoredoksin sistem üzerinden savunma geliştirdiğini kanıtlamıştır.

VII. Tiyoredoksin sistem proteinleri arası ilişkinin anlaşılması için yapılan western blot analizi sonucu karaciğer dokusunda TRXR ve TXNIP kantitatif protein ekspresyon seviyesinde önemli derecede artış tespit edildi. Elde edilen bu veriler dokuda TXNIP protein ekspresyonundaki artışın TRX i baskılayarak ROS artışına neden olduğu ve aynı zamanda TRXR protein ekspresyonundaki artış da TXNIP ve TRXR arasında TRX aktivasyonu veya inhibisyonu için rekabetli bir durum olduğunu göstermiştir. Farklı bir yaklaşım olarak demirin de bu proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarında değişimler meydana getirebileceğini göstermiştir. Böbrek dokusunda ise TRXR kantitatif protein ekspresyon seviyesinde önemli derecede artış TXNIP kantitatif protein ekspresyon seviyesinde önemli derecede azalış tespit edildi. Bu sonuç ise böbrek dokusunda TRXR ve TRX kompleksi sonucu TRX aktivasyonu ve buna bağlı olarak

TXNIP inhibisyonu meydana geldiğini ve dokuda antioksidan savunma sisteminin tiyoredoksin sistem üzerinden beklenen şekilde ilerlediği ve TRX aktivasyonu ile ROS'ların nötralize edildiği görülmüştür.



KAYNAKLAR

- Agarwal, R., Vasavada, N., Sachs, N. G. and Chase, S. 2004. Oxidative stress and renal injury with intravenous iron in patients with chronic kidney disease. *Kidney international*, 65 (6), 2279-2289.
- Aisen, P., Enns, C. and Wessling-Resnick, M. 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33 (10), 940-959.
- Anonymous, <https://www.lenntech.com/periodic/elements/fe.htm>; 2017.
- Anonymous, <https://thermedicalbiochemistrypage.org/iron-copper.php#iron>; 02.05.2018.
- Ansari, N. H., Awasthi, Y. C. and Srivastava, S. K. 1980. Role of glycosylation in protein disulfide formation and cataractogenesis. *Experimental eye research*, 31 (1), 9-19.
- Arlet, J.-B., Pouchot, J., Lasocki, S., Beaumont, C. and Hermine, O. 2013. Suppl mentation en fer: indications, limites et modalit s. *La Revue de médecine interne*, 34 (1), 26-31.
- Arner, E. S. and Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in cancer biology*, Elsevier.
- Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., Campagna, J. A., Chung, R. T., Schneyer, A. L. and Woolf, C. J. 2006. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature genetics*, 38 (5), 531.
- Bastem, A. (2017). Akut İnflamasyonun Antioksidan Sistem  zerine Etkisinin Sı an Karaci er Dokusunda Moleküler Seviyede Ara tırılması, Atatürk Üniversitesi.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. and Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5 (1), 9.
- Brissot, P., Ropert, M., Le Lan, C. and Lor al, O. 2012. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820 (3), 403-410.
- Broide, E., Reifen, R., Matalon, S., Berkovich, Z. and Shirin, H. 2018. Expression of Duodenal Iron Transporter Proteins in Diabetic Patients with and without Iron Deficiency Anemia. *Journal of diabetes research*, 2018
- Budak, H. K., E.F.; G n l, N.;  akır,  .N.; Bastem, A. (2016). Western Blot Tekni i.
- Budak, H., Ceylan, H., Kocpinar, E. F., Gonul, N. and Erdogan, O. 2014a. Expression of Glucose- 6- Phosphate Dehydrogenase and 6- Phosphogluconate Dehydrogenase in Oxidative Stress Induced by Long- Term Iron Toxicity in Rat Liver. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 28 (5), 217-223.
- Budak, H., Kocpinar, E. F., Gonul, N., Ceylan, H., Erol, H. S. and Erdogan, O. 2014b. Stimulation of gene expression and activity of antioxidant related enzyme in Sprague Dawley rat kidney induced by long-term iron toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166 44-50.
- Camaschella, C. 2015. Iron-deficiency anemia. *New England journal of medicine*, 372 (19), 1832-1843.
- Chekhun, V., Lozovska, Y. V., Burlaka, A., Lukyanova, N., Todor, I. and Naleskina, L. 2014. Peculiarities of antioxidant system and iron metabolism in organism

- during development of tumor resistance to cisplatin. *Experimental oncology*, (36, № 3), 196-201.
- Chung, J. and Wessling-Resnick, M. 2003. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 40 (2), 151-182.
- Circu, M. L. and Aw, T. Y. 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823 (10), 1767-1777.
- Daher, R., Manceau, H. and Karim, Z. 2017. Iron metabolism and the role of the iron-regulating hormone hepcidin in health and disease. *La Presse Médicale*, 46 (12), e272-e278.
- Denardo, A., Arosio, P. and Carmona, D. F. Production Of Recombinant Human BMP6 and Peptides For The Study Of Heparin Binding Activity.
- Dev, S. and Babitt, J. L. 2017. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, 21 (S1),
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B. and Zapata, A. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 403 (6771), 776.
- Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K. and Sobey, C. G. 2011. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery*, 10 (6), 453.
- Dunn, L. L., Buckle, A. M., Cooke, J. P. and Ng, M. K. 2010. The emerging role of the thioredoxin system in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30 (11), 2089-2098.
- Dunn, L. L., Simpson, P. J., Prosser, H. C., Lecce, L., Yuen, G. S., Buckle, A., Sieveking, D. P., Vanags, L. Z., Lim, P. R. and Chow, R. W. 2014. A critical role for thioredoxin-interacting protein in diabetes-related impairment of angiogenesis. *Diabetes*, 63 (2), 675-687.
- Durmuş, A. and Radikalleri, Ü. E. S. O. 2005. Antioksidanlar ve Kırık İyileşmesi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*,
- Finberg, K. E., Heeney, M. M., Campagna, D. R., Aydınok, Y., Pearson, H. A., Hartman, K. R., Mayo, M. M., Samuel, S. M., Strouse, J. J. and Markianos, K. 2008. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature genetics*, 40 (5), 569.
- Finch, C. 1994. Regulators of iron balance in humans. *Blood*, 84 (6), 1697-1702.
- Fiorelli, G. 2007. Serum ferritin and erythrocyte indices in iron overload. *Blood Transfusion*, 5 (4), 187.
- Fox, P. L. 2003. The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship. *Biometals*, 16 (1), 9-40.
- Galaris, D. and Pantopoulos, K. 2008. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 45 (1), 1-23.
- Ganz, T. and Nemeth, E. 2012. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823 (9), 1434-1443.
- Gitler, C., Zarmi, B., Kalef, E., Meller, R., Zor, U. and Goldman, R. 2002. Calcium-dependent oxidation of thioredoxin during cellular growth initiation. *Biochemical and biophysical research communications*, 290 (2), 624-628.

- Gozzelino, R. and Arosio, P. 2016. Iron homeostasis in health and disease. *International journal of molecular sciences*, 17 (1), 130.
- Grotto, H. Z. 2010. Iron physiology and metabolism. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32 08-17.
- Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C. and Rochette, L. 2014. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Molecular nutrition & food research*, 58 (8), 1721-1738.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. and Hediger, M. A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388 (6641), 482.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Hisar, O., Köksal, E. and Reiter, R. J. 2009. Melatonin administration increases antioxidant enzymes activities and reduces lipid peroxidation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) erythrocytes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33 (3), 241-245.
- Halpner, A. D., Handelman, G. J., Belmont, C. A., Harris, J. M. and Blumberg, J. B. 1998. Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9 (6), 355-359.
- Hamid, A., Aiyelaagbe, O., Usman, L., Ameen, O. and Lawal, A. 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of pure and applied Chemistry*, 4 (8), 142-151.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U. and Andrews, N. C. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *cell*, 117 (3), 285-297.
- Hisabori, T. and Hara, S. 2013. Kinetic analysis of the interactions between plant thioredoxin and target proteins. *Frontiers in plant science*, 4 508.
- Hofer, T., Marzetti, E., Seo, A. Y., Xu, J., Knutson, M. D. and Leeuwenburgh, C. 2008. Mechanisms of iron regulation and oxidative stress in sarcopenia and neurodegenerative diseases. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1-22.
- Holben, D. H. and Smith, A. M. 1999. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 99 (7), 836-843.
- Holmes, K., Mulholland, F., Pearson, B. M., Pin, C., McNicholl-Kennedy, J., Ketley, J. M. and Wells, J. M. 2005. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology*, 151 (1), 243-257.
- Huang, C., Zhang, Y., Kelly, D. J., Tan, C. Y., Gill, A., Cheng, D., Braet, F., Park, J.-S., Sue, C. M. and Pollock, C. A. 2016. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) regulates tubular autophagy and mitophagy in diabetic nephropathy through the mTOR signaling pathway. *Scientific reports*, 6 29196.
- Kalinowski, D. S. and Richardson, D. R. 2005. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological reviews*, 57 (4), 547-583.
- Kand'ár, R., Žáková, P. and Mužáková, V. 2006. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 365 (1-2), 249-256.

- Kang, H.-J., Choi, S.-W., Heo, D.-H., Jeong, M.-Y., Sung, H.-C. and Yun, C.-W. 2008. A novel role for thioredoxin reductase in the iron metabolism of *S. cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 371 (1), 63-68.
- Karabulut, H. and Gülay, M. Ş. 2016. Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4 (1),
- Kautz, L., Besson-Fournier, C., Meynard, D., Latour, C., Roth, M.-P. and Coppin, H. 2011. Iron overload induces BMP6 expression in the liver but not in the duodenum. *Haematologica*, 96 (2), 199-203.
- Kocpinar, E. F. (2015). Tip60 Geninin Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Araştırılması Atatürk Üniversitesi.
- Koharyova, M. and Kolarova, M. 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *General physiology and biophysics*, 27 (2), 71-84.
- Kumar, J. K., Tabor, S. and Richardson, C. C. 2004. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (11), 3759-3764.
- Lee, S., Kim, S. M. and Lee, R. T. 2013. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 18 (10), 1165-1207.
- Light, W. and Olson, J. S. 1990. Transmembrane movement of heme. *Journal of biological chemistry*, 265 (26), 15623-15631.
- Lincoln, D. T., Ali, E. E., Tonissen, K. F. and Clarke, F. M. 2003. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer research*, 23 (3B), 2425-2433.
- Lu, J. and Holmgren, A. 2012. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxidants & redox signaling*, 17 (12), 1738-1747.
- Lu, J. and Holmgren, A. 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66 75-87.
- Mahmood, T. and Yang, P.-C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4 (9), 429.
- McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J. and Farzaneh, F. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular cell*, 5 (2), 299-309.
- Mehta, S. K. and Gowder, S. J. T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, InTech.
- Meneghini, R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 23 (5), 783-792.
- Messner, D. J., Murray, K. F. and Kowdley, K. V. (2012). Mechanisms of Hepatocyte Detoxification. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition)*, Elsevier: 1507-1527.
- Meyron- Holtz, E. G., Ghosh, M. C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U. V., Land, W., Ollivierre- Wilson, H., Grinberg, A. and Love, P. 2004. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *The EMBO journal*, 23 (2), 386-395.
- Muriel, P. and Gordillo, K. R. 2016. Role of oxidative stress in liver health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016

- Nemeth, E. and Ganz, T. 2006. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.*, 26 323-342.
- Nemeth, E. and Ganz, T. 2009. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta haematologica*, 122 (2-3), 78-86.
- Niederkofler, V., Salie, R. and Arber, S. 2005. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *The Journal of clinical investigation*, 115 (8), 2180-2186.
- Noguchi, N. 2008. Role of oxidative stress in adaptive responses in special reference to atherogenesis. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 43 (3), 131-138.
- Oliveira, L., Bouton, C. and Drapier, J.-C. 1999. Thioredoxin Activation of Iron Regulatory Proteins Redox Regulation Of RNA Binding After Exposure To Nitric Oxide. *Journal of biological chemistry*, 274 (1), 516-521.
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A. and Devireddy, L. 2012. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51 (29), 5705-5724.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P. and Loréal, O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *Journal of biological chemistry*, 276 (11), 7811-7819.
- Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A. M. and Martínez-Pastor, M. T. 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics*, 9 (11), 1483-1500.
- Puntarulo, S. 2005. Iron, oxidative stress and human health. *Molecular aspects of medicine*, 26 (4-5), 299-312.
- Ray, P. D., Huang, B.-W. and Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24 (5), 981-990.
- Reiter, R. J., Paredes, S. D., Manchester, L. C. and Tan, D.-X. 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44 (4), 175-200.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (11), 1603-1616.
- Richardson, D., Kalinowski, D., Lau, S., Jansson, P. and Lovejoy, D. 2009. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (7), 702-717.
- Schmidt, P. J. 2015. Regulation of iron metabolism by hepcidin under conditions of inflammation. *Journal of biological chemistry*, 290 (31), 18975-18983.
- Schulze, P. C., Yoshioka, J., Takahashi, T., He, Z., King, G. L. and Lee, R. T. 2004. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *Journal of biological chemistry*, 279 (29), 30369-30374.
- Silvestri, L. 2013. Inhibiting the hepcidin inhibitor for treatment of iron overload. *Blood*, 121 (7), 1068-1069.
- Silvestri, L., Nai, A., Pagani, A. and Camaschella, C. 2014. The extrahepatic role of TFR2 in iron homeostasis. *Frontiers in pharmacology*, 5 93.

- Spindel, O. N., World, C. and Berk, B. C. 2012. Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms. *Antioxidants & redox signaling*, 16 (6), 587-596.
- Steenvoorden, D. P. and van Henegouwen, G. M. B. 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41 (1-2), 1-10.
- Sumida, Y., Nakashima, T., Yoh, T., Furutani, M., Hirohama, A., Kakisaka, Y., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Mitsuyoshi, H. and Okanoue, T. 2003. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 38 (1), 32-38.
- Takahashi, K. and Cohen, H. J. 1986. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*, 68 (3), 640-645.
- Tangvarasittichai, S. 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 6 (3), 456.
- Tanito, M., Nakamura, H., Kwon, Y.-W., Teratani, A., Masutani, H., Shioji, K., Kishimoto, C., Ohira, A., Horie, R. and Yodoi, J. 2004. Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxidants and Redox Signaling*, 6 (1), 89-97.
- Temel, Y., Bozkuş, T. and Çiftçi, M. Glutatyon Redüktaz (GR) Enziminin Japon Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7 (3), 143-150.
- Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1660 (1), 171-199.
- Uzel, C. and Conrad, M. E. (1998). Absorption of heme iron. *Seminars in hematology*.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39 (1), 44-84.
- Veuthey, T., D'Anna, M. a. C. and Roque, M. E. 2008. Role of the kidney in iron homeostasis: renal expression of Prohepcidin, Ferroportin, and DMT1 in anemic mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295 (4), F1213-F1221.
- Vulpe, C. D., Kuo, Y.-M., Murphy, T. L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J. and Anderson, G. J. 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature genetics*, 21 (2), 195.
- Wakamatsu, T. H., Dogru, M. and Tsubota, K. 2008. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 71 (6), 72-79.
- Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B. M., Favrat, B. and Tissot, J.-D. 2014. Physiology of iron metabolism. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 41 (3), 213-221.
- Wang, J. and Pantopoulos, K. 2011. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal*, 434 (3), 365-381.
- Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zervas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T. and Mishra, L. 2005. A role of SMAD4 in iron metabolism

- through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism*, 2 (6), 399-409.
- Ward, D. M. and Kaplan, J. 2012. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823 (9), 1426-1433.
- Westermeyer, R. 1997. *Electrophoresis in Practice, A Guide to Methode and Applications of DNA and Protein Separations*.
- Winter, W. E., Bazydlo, L. A. and Harris, N. S. 2014. The molecular biology of human iron metabolism. *Laboratory medicine*, 45 (2), 92-102.
- Wood, J. C. 2014. Guidelines for quantifying iron overload. *ASH Education Program Book*, 2014 (1), 210-215.
- Zainal, T. A., Weindruch, R., Szewda, L. I. and Oberley, T. D. 1999. Localization of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in kidney following iron overload. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1181-1193.
- Zaritsky, J., Young, B., Wang, H.-J., Westerman, M., Olbina, G., Nemeth, E., Ganz, T., Rivera, S., Nissenson, A. R. and Salusky, I. B. 2009. Hepcidin—a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4 (6), 1051-1056.
- Zhang, X., Zhang, J.-H., Chen, X.-Y., Hu, Q.-H., Wang, M.-X., Jin, R., Zhang, Q.-Y., Wang, W., Wang, R. and Kang, L.-L. 2015. Reactive oxygen species-induced TXNIP drives fructose-mediated hepatic inflammation and lipid accumulation through NLRP3 inflammasome activation. *Antioxidants & redox signaling*, 22 (10), 848-870.
- Zimmermann, M. B. and Hurrell, R. F. 2007. Nutritional iron deficiency. *The Lancet*, 370 (9586), 511-520.

ÖZGEÇMİŞ

16 Mayıs 1993 tarihinde Bursa’da dünyaya geldi. İlk ve orta okul eğitimini Erzurum Sabancı İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Erzurum Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi’nde 2008-2011 yılları arasında lise eğitimini tamamladı. 2012-2016 tarihleri arasında Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm’nde lisans eğitimini tamamlamasının ardından aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm, Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. 2016 yılında başlayıp 2018 yılında bitirdiği yüksek lisans eğitimi esnasındaki laboratuvar çalışmalarını Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı laboratuvarlarında ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)’da gerçekleştirmiştir.